

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:

**APROXIMACIONES SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE HETEROCICLOS DERIVADOS
DE HIDRAZINA CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

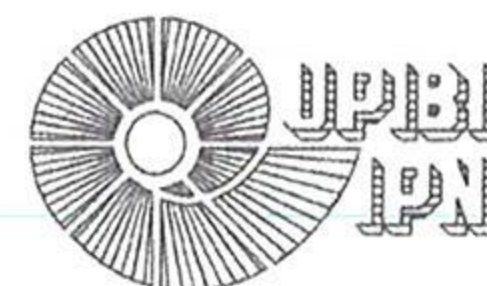
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO FARMACÉUTICO

PRESENTA:
MARIO PÉREZ VENEGAS

DIRECTOR:
DR. MARCO AUGUSTO BRITO ARIAS

EVALUADORES:
**DR. EFRÉN VENANCIO GARCÍA BÁEZ
IBQ. ALFONSO HERNÁNDEZ MUÑOZ**

México, D. F. 19 de Febrero 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

La Comisión de Evaluación para Opción Curricular ha revisado el trabajo escrito titulado: **“Aproximaciones sintéticas para la obtención de heterociclos derivados de hidrazina con posible actividad antiparasitaria”** que presenta el alumno **Mario Pérez Venegas** con número de boleta **2011620324** de la carrera de **Ingeniería Farmacéutica**.

Después de revisar los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan **APROBAR EL TRABAJO ESCRITO**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

México D.F, a 19 de Febrero del 2015

Dr. Marco Augusto Brito Arias

Director de Proyecto

Dr. Efrén Venancio García Báez

Evaluador

IBQ. Alfonso Hernández Muñoz

Evaluador

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Mario Pérez Venegas**, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada ***Aproximaciones sintéticas para la obtención de heterociclos derivados de hidrazina con posible actividad antiparasitaria***, en adelante “La Tesina” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **como páginas web, buscadores, revistas y bibliotecas** “La Tesina” por un periodo de **un año** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesina”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesina”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesina”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesina” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., a 19 de Febrero del 2015.

Atentamente



Mario Pérez Venegas

APROXIMACIONES SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE HETEROCICLOS DERIVADOS DE HIDRAZINA CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.

Marco A. Brito Arias*, Mario Pérez Venegas

Departamento de química de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología UPIBI-IPN. Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07340, México D.F. mbrito@ipn.mx

FECHA: 19 de Febrero 2015

Palabras clave: Hidroquinazolona, *T.cruzi*, Enfermedad de Chagas, Tripanotión reductasa.

Introducción. La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*, es una enfermedad ampliamente distribuida en México para la cual no existe un fármaco totalmente eficaz o vacuna. Se propone una ruta de síntesis para generar un heterociclo hidroquinazolónico con posible actividad antiparasitaria que pueda ser útil en diferentes etapas de la enfermedad y que presente sustituyentes que mejoren su actividad sobre enzimas clave (1).

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar aproximaciones sintéticas para la obtención de heterociclos derivados de hidrazina con posible actividad antiparasitaria

Metodología. La ruta de síntesis para obtener el heterociclo hidroquinazolónico (Figura 1) muestra la reacción inicial entre hidrazina y 2-nitrobenzaldehído para obtener **2**, que después se reduce con Pd-C(10%) para obtener **3**, este intermediario reacciona con cloroformiato de etilo para generar **4** que a su vez se hace reaccionar con NaBH₄ y Metanol en agitación moderada para finalizar con el heterociclo **5**.

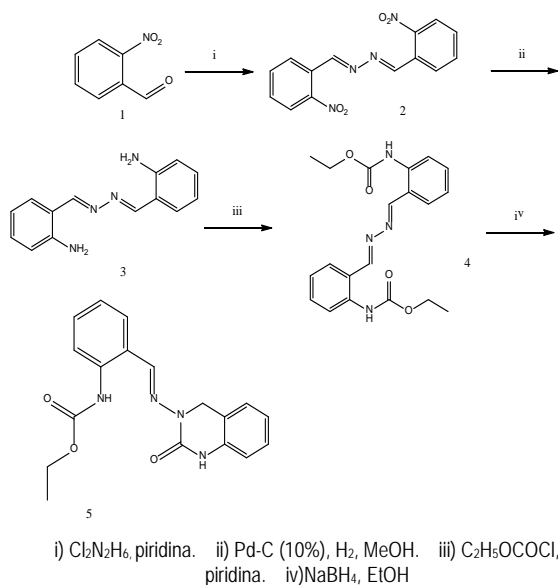


Figura 1. Ruta de síntesis propuesta para obtener 5.

Resultados y discusión. La ruta de síntesis descrita en la Figura 1 resultó satisfactoria para cada uno de los pasos ahí identificados, conduciendo a la formación del heterociclo hidroquinazolónico **5** en rendimiento del 51%; cada uno de los intermediarios fue caracterizado por RMN de ¹H y ¹³C, además el producto final se cristalizó a través de un sistema de evaporación lenta usando DMSO-d₆ como disolvente, la cristalografía del intermediario **5** se muestra en la figura 2 y el resultado del análisis cristalográfico indica un sistema

P2₁/c con valores de celda de a = 7.5046 (3) Å, b = 20.7529 (11) Å y c = 11.1743 (4) Å, con α = 90.000 (0) °, β = 97.890 (3) ° y γ = 90.000 (0) °, generando así un sistema cristalino monoclinico. Se realizó una primera aproximación de la unión del ciclo hidroquinazolónico con enzimas clave de *T.cruzi*, una cistein proteasa (cruzaína) y una reductasa (tripanotión reductasa), la figura 3 muestra la aproximación generada del intermediario **5** con la enzima cruzaína.

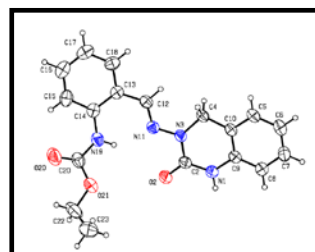


Figura 2. Diagrama ortep para el ciclo hidroquinazolónico.

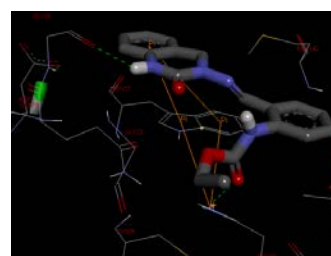


Figura 3. Interacción del ciclo hidroquinazolónico sobre cruzaína.

Conclusiones y perspectivas. Se realizaron aproximaciones sintéticas para la obtención del ciclo hidroquinazolónico, además se caracterizaron todos los intermediarios por RMN ¹H y ¹³C, así como el ciclo hidroquinazolónico por difracción de rayos X. Se realizaron una serie de aproximación moleculares (Docking) para el ciclo hidroquinazolónico sobre Tripanotión reductasa y cruzaína, obteniendo buenas aproximaciones.

Agradecimientos. Se agradece a COFAA y SIP por apoyo económico.

Referencias.

- Patterson Stephen, et. al. Dihydroquinazolines as a Novel Class of Trypanosoma Brucei Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography, Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 6514-6530
- Cruz-Reyes Alejandro, Pickering-López José Miguel, Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – A Review, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101 (4), 345-354

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES.

Guadalupe y Alejandro, por acompañarme siempre bajo cualquier circunstancia brindándome su apoyo y cariño incondicional; ustedes son la figura de admiración que me inspira a seguir adelante, sientan cada triunfo en mí vida como propio.

A MIS ABUELOS.

Carmen y Alfredo, por ser una fuente inagotable de enseñanza y afecto; han dado todo por mí y estaré siempre infinitamente agradecido, me siento orgulloso de ser su nieto y espero lograr que ustedes sientan el mismo orgullo hacia mí, estando cerca o lejos.

A MIS HERMANOS.

Erika, Francisco y Alfredo, ustedes serán siempre mis compañeros de vida; gracias por caminar junto a mí en cada paso y por afrontar lo bueno y lo malo que hemos superado juntos, nunca podría imaginar una vida sin ustedes o sin la felicidad que me provocan.

A MI FAMILIA.

A todos ustedes que han estado cerca, a los que me vieron nacer, los que he visto nacer, los que se han incluido y a quien yo he incluido a mí familia, son más de lo que podría pedir para vivir plenamente, espero poder demostrar a mi manera el cariño que merecen por formar parte de mí vida y de mis logros.

AL DR. MARCO AUGUSTO BRITO ARIAS.

Usted que es mi profesor, mentor y amigo; nunca podré demostrar el agradecimiento que guardo por permitirme trabajar a su lado y por instruirme en el arte de la química, sé que no lo he defraudado y que mi trabajo se cimentara en todo aquello que usted me enseñó.

A MIS AMIGOS.

A todos ustedes que fueron parte de mi educación y que brindaron su esfuerzo y tiempo para lograr nuestros objetivos, espero dejar en ustedes el mismo sentimiento que yo les guardo.

A todos ustedes, siéntanse partícipes de este trabajo; el esfuerzo y los logros son compartidos.

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 PARÁSITOS.....	1
1.2 TRIPANOSOMAS.....	2
1.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	3
1.3.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO.....	4
1.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	6
1.5 HIDROQUINAZOLONAS COMO POSIBLES INHIBIDORES SELECTIVOS DE ENZIMAS ESPECÍFICAS DEL PARÁSITO.....	7
1.5.1 FARNESIL PIROFOSFATO SINTASA.....	7
1.5.2 TRANS-SIALIDASA.....	8
1.5.3 α -HIDROXIÁCIDO DESHIDROGENASA.....	8
1.5.4 CRUZAÍNA Y TRIPANOTIÓN REDUCTASA.....	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. METODOLOGÍA	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1 EQUIPOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.....	13
5.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	13
5.2.1 Bis-(1E,1'E)-(2-nitrobenzil)hidrazona (2).....	13
5.2.2 Bis-(1E,1'E)-(2-aminobencil)hidrazona (3).....	14
5.2.3 Bis-(1E,1'E)-(2-etilcarbamato benzil)hidrazona (4).....	14
5.2.4 3-(2-etilcarbamato benzilimina)hidroquinazolona (5).....	15
6. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	16
7. CONCLUSIONES	31
8. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	32
9. REFERENCIAS	34
10. ANEXOS	35
10.1 Anexo 1.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Vista microscópica de un ectoparásito (izquierda) y fotografía microscópica de un helminto (al centro) y de un protozooario (derecha).....	1
Figura 2. Distribución del número de casos de <i>T. cruzi</i> estimados en Norteamérica (2013) ⁵	3
Figura 3. <i>Triatoma barberi</i> (chinche besucona).....	4
Figura 4. Estadios del parásito en el cuerpo del huésped vertebrado e invertebrado ¹⁰	4
Figura 5. Distribución de casos registrados en el Sistema de Salud.	5
Figura 6. Distribución de la enfermedad en la República Mexicana.	5
Figura 7. Distribución de la cantidad de pruebas serológicas por estado.	6
Figura 8. Estructuras de los diferentes fármacos que pueden usarse en el tratamiento contra <i>T. cruzi</i>	7
Figura 9. Esquema de la reacción catalizada por la enzima tripanotión reductasa ¹⁶	9
Figura 10. Ruta de síntesis para la obtención del ciclo dihidroquinazolónico 5.....	12
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H para el intermediario 2 en CDCl ₃	16
Figura 12. Espectro de RMN ¹³ C para el intermediario 2 en CDCl ₃	17
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H para el intermediario 3 en CDCl ₃	18
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H para el intermediario 3 en DMSO-d ₆	19
Figura 15. Espectro de RMN ¹³ C para el intermediario 3 en DMSO-d ₆	19
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H para el intermediario 4 en CDCl ₃	20
Figura 17. Espectro de RMN ¹³ C para el intermediario 4 en CDCl ₃	21
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d ₆	22
Figura 19. Espectro de RMN ¹³ C para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d ₆	23
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H bidimensional para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d ₆	24
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H bidimensional aumentado para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d ₆	24
Figura 22. Diagrama ortep para el ciclo hidroquinazolónico.....	25
Figura 23. Representación del ciclo hidroquinazolónico donde se muestran las interacciones intermoleculares e intramoleculares	26
Figura 24. Representación de la celda unitaria para el ciclo hidroquinazolónico.	27
Figura 25. Representación del ciclo hidroquinazolónico con algunos residuos del sitio activo de Tripanotión reductasa	29
Figura 26. Representación del ciclo hidroquinazolónico con algunos residuos del sitio activo de Tripanotión reductasa Cruzapaína (Cruzapaína)	30
Figura 27. Funcionalización del ciclo hidroquinazolónico previo al cierre intramolecular.....	32
Figura 28. Desprotección del ciclo hidroquinazolónico a través del grupo carbamato para su funcionalización...	33
Figura 29. Funcionalización del ciclo hidroquinazolónico por nitración.....	33

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PARÁSITOS

Un parásito es un organismo que vive sobre o dentro de un organismo huésped de distinta especie, su subsistencia depende de la adquisición de alimento a expensas del hospedero y de generar las condiciones necesarias para evadir las defensas de las cuales el hospedero dispone para su eliminación.

Todos los parásitos generan afectaciones al huésped que pueden presentarse como deficiencias vitamínicas o proteicas, enfermedades del tracto digestivo, pulmonares o coronarias e inclusive afectaciones neuronales que pueden llegar a la muerte del huésped, aunque en general, los parásitos no matan a su hospedero ya que esto desembocaría en su propia muerte. Existen tres tipos principales de parásitos que pueden causar enfermedades a los seres humanos, estos son: los ectoparásitos, los helmintos y los protozoarios (Figura 1).



Figura 1. Vista microscópica de un ectoparásito (izquierda) y fotografía microscópica de un helminto (al centro) y de un protozooario (derecha).

Los ectoparásitos incluyen a una variedad de organismos en los cuales se pueden encontrar a los artrópodos hematófagos, garrapatas, pulgas, piojos y ácaros, que viven sobre o en la piel y se alimentan de las células epidérmicas muertas, estos parásitos son vectores de transmisión de enfermedades que se adquieren por el huésped cuando el parásito se alimenta o defeca, aunque también pueden causar afectaciones cuando se encuentran en grandes cantidades sobre el huésped como dermatitis o necrosis de piel¹.

Los helmintos son entes multicelulares de tamaño variado menos organizados celularmente que los ectoparásitos, los cuales en su etapa adulta son fácilmente visibles e incapaces de multiplicarse en el huésped; en su mayoría son parasitarios y ocasionan enfermedades severas para el cuerpo, se introducen al huésped a través de alimentos contaminados y generan quistes

que facilitan su supervivencia y capacidad de infección², las enfermedades causadas por los helmintos generalmente son asintomáticas y se presentan en el tracto digestivo causando alteraciones nutricionales severas.

Los protozoarios son organismos eucariontes unicelulares de carácter parasitario en la mayoría de los casos, son menos complejos que los helmintos y son capaces de sobrevivir en los seres humanos con gran facilidad a pesar de la carencia de pared celular; su transmisión se efectúa de humano a humano por la vía fecal-oral o por artrópodos vectores en el caso de los protozoarios que infectan tejidos o sangre; generan enfermedades de leves a severas en el huésped infectado y tienen la capacidad de iniciar una infección en el huésped a partir de una sola célula, están ampliamente distribuidos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y generan enfermedades como la amibiasis, la giardiasis, la enfermedad del sueño y la enfermedad de Chagas, estas últimas causadas por dos diferentes especies de tripanosomas, *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) y *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

1.2 TRIPANOSOMAS

Los tripanosomas pertenecen a un grupo biológico amplio del reino Eucariota, clase Euglenoza, orden Cinetoplastida, que se caracterizan por la presencia de un organelo particular denominado *cinetoplasto* y por utilizar dos huéspedes para completar su ciclo de vida, uno invertebrado y otro vertebrado³, dentro del género existen especies que son de vida libre y especies parasitarias, de los cuales *T. brucei* y *T. cruzi* han sido ampliamente estudiadas por su patogenicidad en humanos.

Estas especies pertenecen a la familia *Tripanosomatidae* pero difieren en aspectos biológicos, el vector de transmisión y la capacidad infectiva. *T. brucei* vive y se replica en el torrente sanguíneo, es inoculado al huésped a través del piquete del vector de transmisión y desarrolla la enfermedad del sueño, una enfermedad endémica en 36 países del África subsahariana en donde la mosca tsetsé, que es el vector de transmisión, habita.

Por otro lado *T. cruzi* es un parásito intracelular, es depositado *in situ* a través de las heces del vector hematófago (chinchas) y cuando ha infectado al huésped genera la enfermedad de Chagas³, la cual está ampliamente distribuida en el continente americano, presentándose con mayor incidencia en Centroamérica y la parte baja de Norteamérica (Figura 2), el vector de esta enfermedad se encuentra muy bien distribuido a pesar de que se han realizado campañas contra su reproducción⁴; las enfermedades parasitarias, como la enfermedad de Chagas, se encuentran dentro de las 10 enfermedades más letales en América latina que afectan a la población en todas

las etapas de crecimiento, en todos los niveles económicos y en especial, en México, en todos los estados del país.



Figura 2. Distribución del número de casos de *T. cruzi* estimados en Norteamérica (2013)⁵.

1.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (definida así por Carlos Chagas en 1909) o tripanosomiasis americana, es una enfermedad generada por el parásito *T. cruzi*, antes mencionado, se considera una afectación endémica en el continente americano y una enfermedad recurrente en otras partes del mundo; se calcula que alrededor de 7 a 8 millones de personas están infectadas con este parásito, la mayoría de ellas en América latina⁶, en donde la enfermedad es transmitida a partir de las heces fecales del vector hematófago infectado con el parásito, aunque la infección también puede generarse por el consumo de alimentos contaminados, transfusión de sangre u órganos infectados, transmisión congénita e incluso exposición prolongada al patógeno^{6,7}.

El parásito depende de dos ciclos de vida diferentes, el primero dentro de un huésped invertebrado como lo es *Triatoma barberi*, conocido coloquialmente en México como chinche besucona (Figura 3), y el segundo dentro de un huésped vertebrado (humano); en el primer ciclo el parásito se desarrolla hasta una etapa conocida como tripomastigote metacíclico que se encuentra en las heces de la chinche, y en el segundo ciclo, dentro del huésped vertebrado, el parásito se desarrolla hasta un estadio de amastigote intracelular que puede diferenciarse a su vez a tripomastigote (Figura 4) que participa en la infección de una gran variedad de células^{7,8,10} en

especial del tracto digestivo y cardíacas⁹, siendo estas últimas las más afectadas cuando la enfermedad se vuelve crónica.



Figura 3. *Triatoma barberi* (chínche besucona).

La enfermedad tiene dos fases claramente diferenciadas, la fase aguda y la fase crónica, la primera de ellas es generalmente asintomática aunque pueden existir padecimientos menores como fiebre y náuseas, tiene una duración de dos a tres meses después de la infección inicial y en ella una gran cantidad de parásitos circulan a través del torrente sanguíneo; en la segunda fase los parásitos se acumulan en las células del tracto digestivo y del corazón, dañando estos órganos y generando enfermedades severas que desembocan en la muerte del infectado.

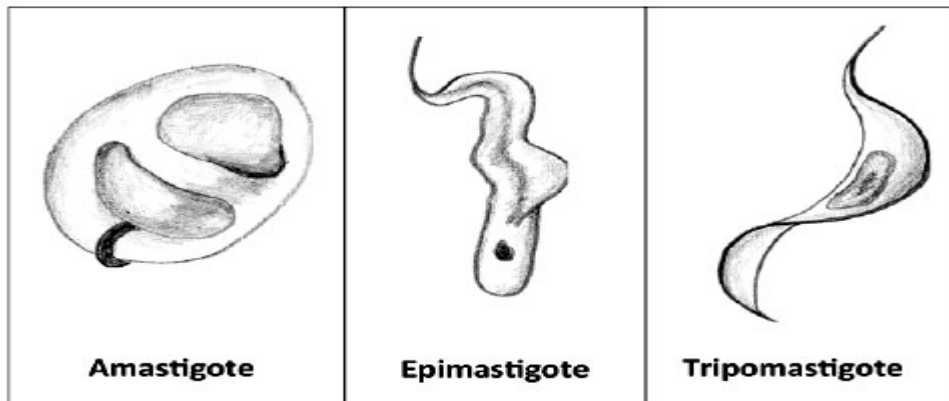


Figura 4. Estadios del parásito en el cuerpo del huésped vertebrado e invertebrado¹⁰.

1.3.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO

En México entre uno y tres millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y 30 millones están en riesgo de ser infectadas¹¹, las zonas en donde se desarrollan cuadros clínicos de la enfermedad con mayor frecuencia son la ciudad de México y Puebla (Figura 5) aunque no precisamente sean

las zonas con mayor diseminación del vector y del parásito, esto se debe a la proximidad de ambas zonas con estados de la república que sufren de la enfermedad con mayor intensidad.

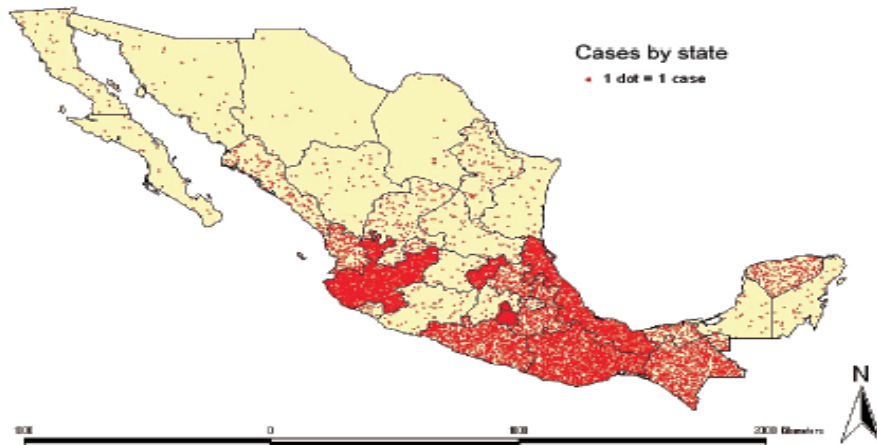


Figura 5. Distribución de casos registrados en el Sistema de Salud.

T. cruzi se presenta con mayor frecuencia en estados en donde la población carece de servicios básicos como lo son el agua potable, luz y drenaje, generando así las condiciones idóneas para exponer al huésped humano al vector transmisor, estos estados son Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Morelos¹² (Figura 6), de los cuales sólo Veracruz y Morelos realizan tres pruebas serológicas para confirmar la enfermedad de Chagas, las cuales son recomendadas para iniciar con el tratamiento de la enfermedad, los estados restantes solo realizan dos pruebas serológicas antes de comenzar el tratamiento y la Ciudad de México, en donde se tiene la mayor concentración de personas infectadas, no realiza algún tipo de prueba serológica¹² (Figura 7).

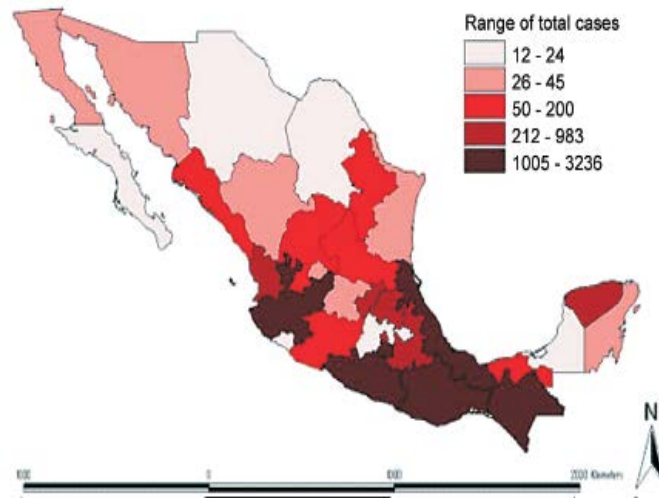


Figura 6. Distribución de la enfermedad en la República Mexicana.

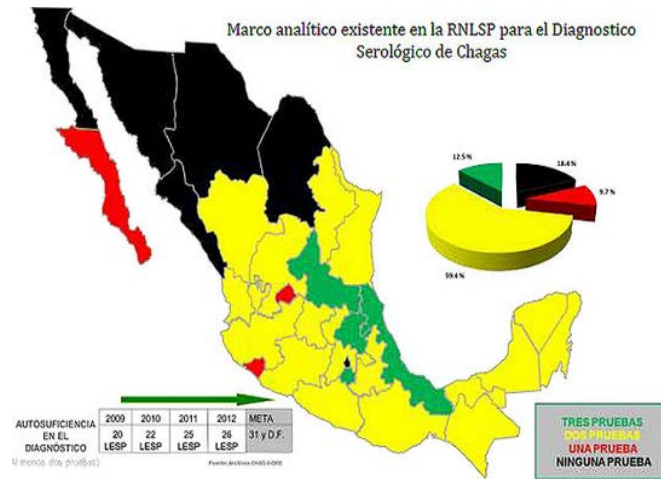


Figura 7. Distribución de la cantidad de pruebas serológicas por estado.

El 67% de los casos de tripanosomiasis causada por *T. cruzi*, terminan en la muerte del infectado¹² por efecto de las lesiones ocasionadas al corazón, el tracto digestivo y muerte súbita por el deterioro de células neuronales.

1.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Aún no existe algún tipo de vacuna para el tratamiento de enfermedades parasitarias, pero existe una amplia variedad de medicamentos que pueden servir en el tratamiento contra *T. cruzi* y se destacan por tener acción terapéutica contra las formas amastigotas del parásito, debido a que las formas de tripomastigote y epimastigote se diferencian de la primera mencionada; estos fármacos son de naturalezas diversas.

Dentro de estos fármacos que pueden servir contra el enfermedad de Chagas se encuentran el **Alopurinol, Itraconazol y Posaconazol, Butionina-Sulfaximina, Cruzipaina y Miltefosina, Benznidazol, Nifurtimox y Alcaloides o derivados de Isoquinolinas naturales**¹³ (Figura 8), todos éstos tienen diferentes mecanismos de acción contra el patógeno y entre ellos el más selectivo en el tratamiento es la Butionina-Sulfoximina que inhibe una enzima específica de los protozoos cinetoplásticos llamada tripanotión reductasa; por razones éticas y de eficacia los únicos que pueden utilizarse para el tratamiento contra la infección en humanos son Benzimidazol y Nifurtimox¹³; la familia de los benznidazoles actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en el parásito ocasionando la degradación de macromoléculas estructurales y eventualmente la muerte del mismo y Nifurtimox actúa generando radicales libres que desgastan al parásito hasta la muerte, ambos se comenzaron a utilizar en el tratamiento contra la enfermedad entre 1970 y 1980 mediante un tratamiento empírico que eventualmente funcionó^{13,14}.

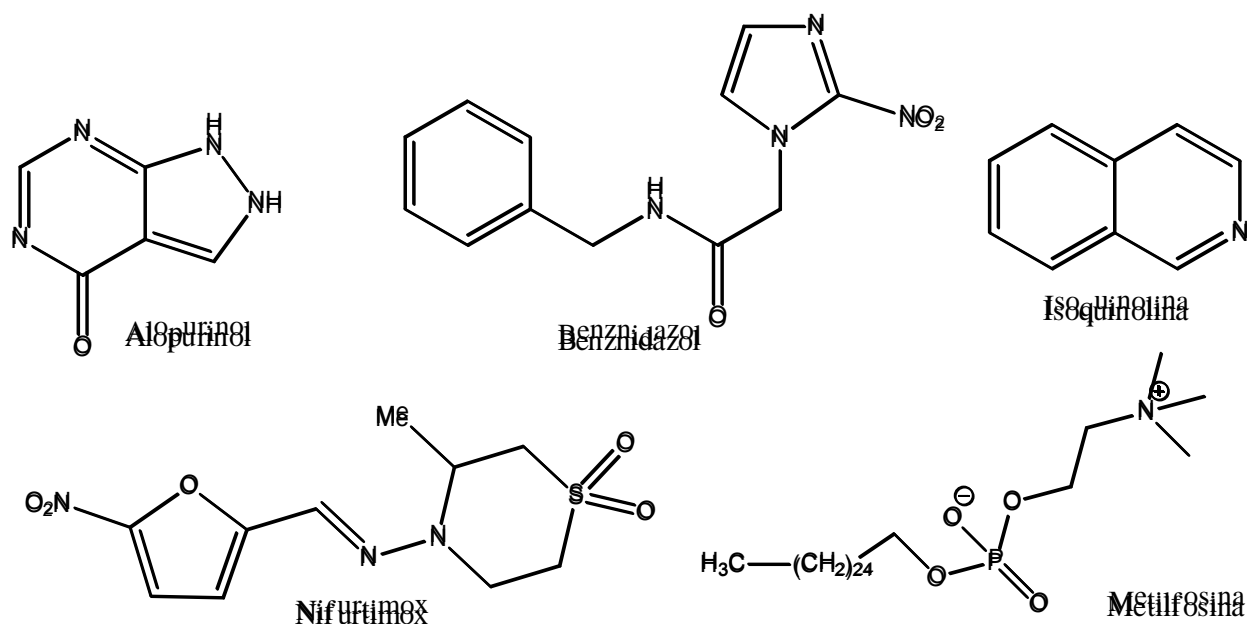


Figura 8. Estructuras de los diferentes fármacos que pueden usarse en el tratamiento contra *T. cruzi*.

1.5 HIDROQUINAZOLONAS COMO POSIBLES INHIBIDORES SELECTIVOS DE ENZIMAS ESPECÍFICAS DEL PARÁSITO.

Se ha descrito una variedad amplia de dianas terapéuticas contra *T. cruzi*, de las cuales las más importantes son aquellas que sólo el parásito genera para su supervivencia, de esta forma, al ser el parásito el único que depende de estas proteínas se puede inhibir su crecimiento y reproducción al inhibir la acción enzimática de estas dianas; entre las principales enzimas que se han estudiado para combatir a este parásito se encuentran la farnesil pirofosfato sintasa, la trans-sialidasa, la α -hidroxiácido deshidrogenasa, la cruzaina y la tripanotión reductasa.

1.5.1 FARNESIL PIROFOSFATO SINTASA

La farnesil pirofosfato sintasa es una enzima involucrada en la ruta metabólica del mevalonato, que es un intermediario en la síntesis de colesterol, se compone de 362 residuos de aminoácidos incluido un ion de Mg^{2+} ; se ha descrito que en las etapas de crecimiento y proliferación del parásito el pirofosfato se sintetiza a una velocidad alta y se acumula en el organismo con una tasa incluso mayor que la adenosin trifosfato, de esta forma, se cree que puede inhibirse el crecimiento del parásito al inhibir la enzima encargada de generar el pirofosfato; los inhibidores propuestos para detener la catálisis realizada por esta enzima tienen propiedades estructurales que les permitan funcionar como inhibidores, a éstos se les conoce como bifosfonatos y se han

desarrollado algunos que a través de aproximaciones *in silico* han demostrado su unión a la enzima¹⁵.

1.5.2 TRANS-SIALIDASA

La trans-sialidasa es una enzima compuesta por 632 residuos de aminoácidos y se encuentra localizada en la superficie del parásito, es capaz de sustraer residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos del huésped que el parásito es incapaz de sintetizar; el ácido siálico es importante para *T. cruzi* debido a que a través de esta molécula el parásito adquiere resistencia al ataque por proteínas del complemento y por anticuerpos con capacidad citolítica. Se han desarrollado moléculas que inhabilitan esta enzima ocasionando que *T. cruzi* deje de recibir ácido siálico, aunque no se ha logrado aún una inhibición lo suficientemente fuerte hacia esta enzima¹⁵.

1.5.3 α -HIDROXIÁCIDO DESHIDROGENASA

La α hidroxiaácido deshidrogenasa es una enzima análoga de la enzima lactato deshidrogenasa que utiliza NADH reducido como cofactor convirtiéndolo en NAD^+ , necesario como agente oxidante en muchas rutas metabólicas; presenta dos tipos de isoenzimas; la tipo I que usa piruvato y butirato como sustrato y el tipo II que utiliza una amplia variedad de cetoácidos como sustratos, de esta forma se han generado inhibidores competitivos de esta enzima siguiendo como regla la similitud estructural con los sustratos naturales, aunque las moléculas deben ser incluidas como profármacos para poder facilitar su entrada al parásito¹⁵.

1.5.4 CRUZAÍNA Y TRIPANOTIÓN REDUCTASA

La cruzaina (o cruzapaína) es la mayor cisteín-proteasa de *T. cruzi*, tiene un dominio catalítico de 215 residuos de aminoácidos y es expresada en todas las etapas de crecimiento del parásito; se han desarrollado un amplia gama de moléculas que inhiben a esta enzima entre las cuales se encuentran las tiosemicarbazonas y los derivados de acil-hidrazina¹⁵.

La tripanotión reductasa es una enzima que reemplaza al glutatión y la glutatión reductasa intracelular, mecanismo principal del sistema tiol-redox humano que se encarga de las especies reactivas del oxígeno, es una enzima esencial y se sobre expresa en *T. cruzi*, es un dímero con un

peso molecular por unidad de 50000, utiliza NADPH y tripanotión disulfuro como sustratos, cada monómero está compuesto por 4 dominios, el dominio III se ha descrito como el dominio catalítico en donde se puede presentar inhibición, de esta forma la enzima se vuelve una importante diana terapéutica que podría utilizarse para combatir la enfermedad de Chagas y cualquier otra afectación por protozoos cinetoplasticos como la enfermedad del sueño¹⁶.

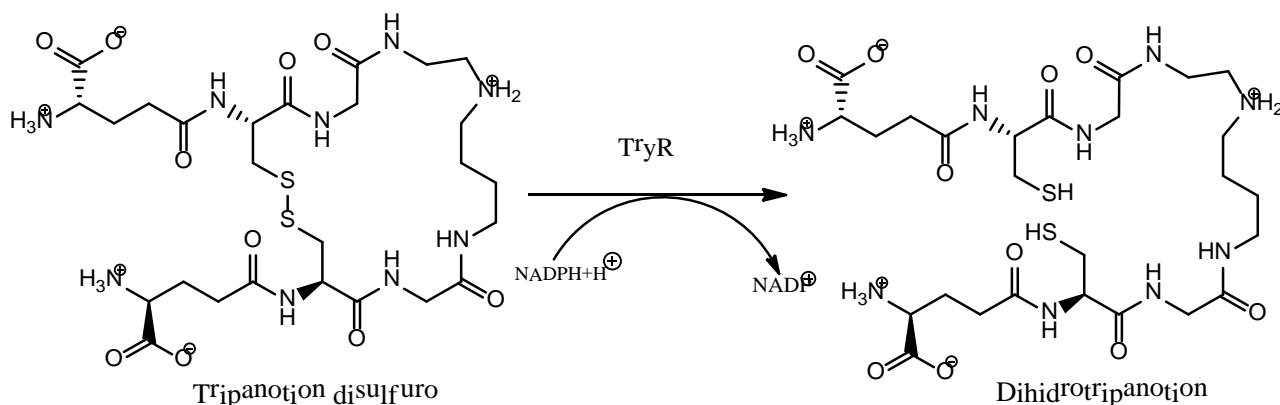


Figura 9. Esquema de la reacción catalizada por la enzima tripanotión reductasa¹⁶.

La butionina-sulfoximina no es la única molécula capaz de inhibir selectivamente la tripanotión reductasa, también existen moléculas como las hidroquinazolininas capaces de inhibir selectivamente y con un bajo IC₅₀ a la enzima¹⁶.

Se ha demostrado que la inhibición enzimática de la tripanotión reductasa depende de que el inhibidor contenga algunos sustituyentes y grupos funcionales, tales como sustituyentes cortos sobre el anillo quinazolinico y una cadena alifática de tamaño medio sobre el nitrógeno en posición 3 del heterociclo, por tanto la síntesis de estructuras análogas a las hidroquinazolinonas podrían inhibir a la enzima con eficacia¹⁶.

2. JUSTIFICACIÓN

La generación de nuevas moléculas heterocíclicas que se sintetizen basadas en parámetros definidos para su acoplamiento con enzimas específicas de un organismo constituye una vía más eficaz para el combate de enfermedades parasitarias que son de difícil tratamiento y que comienzan a generar resistencia contra los medicamentos usados clínicamente para su eliminación desde hace más de 40 años, de esta forma se propone la síntesis de moléculas derivadas de hidrazina que formen un heterociclo hidroquinazolónico con sustituyentes que tentativamente puedan unirse a la enzimas específicas de *T. cruzi* y de esta manera ser usados en el tratamiento de enfermedades por parásitos.

Así mismo se proponen pasos de reacción más simples que permiten llegar a heterociclos dihidroquinazolónicos de una manera más eficiente a través del acoplamiento de hidrazina a la molécula y de reacciones que puedan realizarse fácilmente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

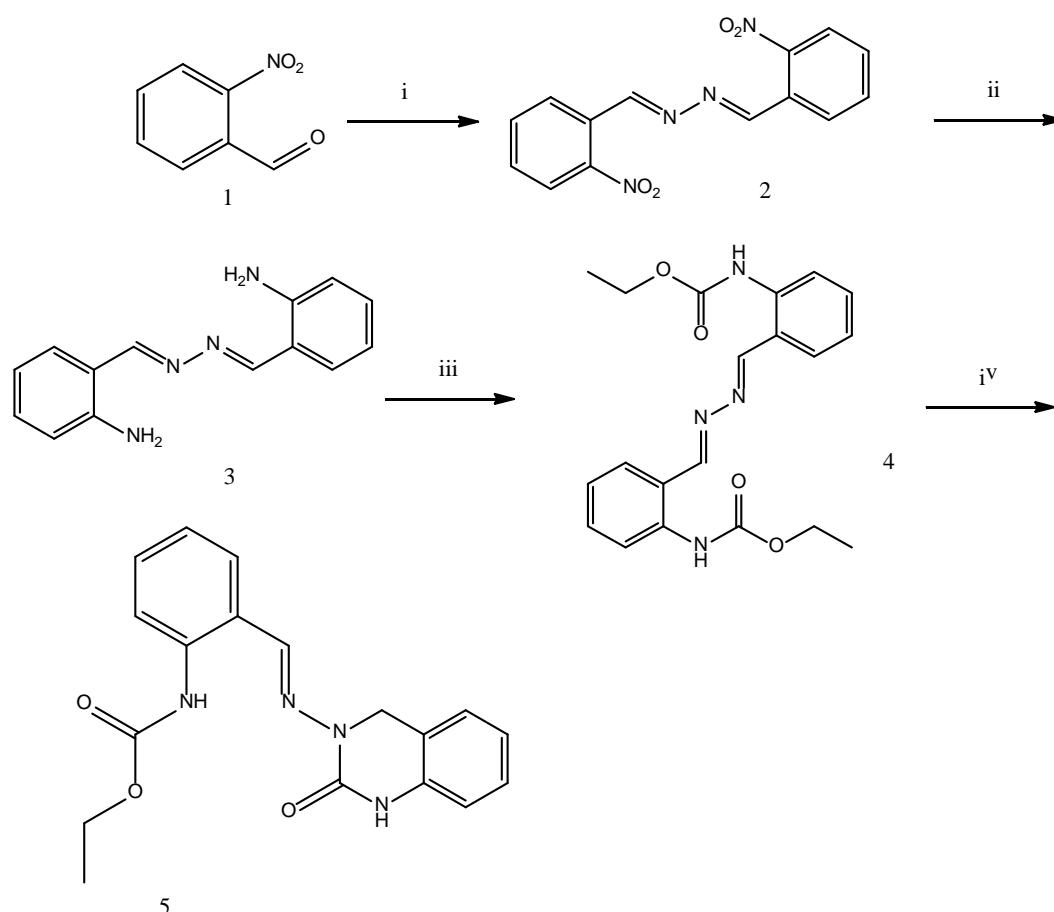
- Desarrollar aproximaciones sintéticas para la obtención de heterociclos derivados de hidrazina con posible actividad antiparasitaria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar intermediarios de hidrazina que sirven de base para generar el heterociclo propuesto.
- Realizar ensayos para la obtención de dihidroquinazolonas a partir de los dímeros de hidrazonas.
- Caracterizar los intermediarios y la molécula cíclica propuesta por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C y difracción de rayos X.

4. METODOLOGÍA

La síntesis de la dihidroquinazolona se llevo a cabo siguiendo las reacciones propuestas en el esquema de reacción (Figura 10), que consistió en la preparación de **2** a partir de 2-nitrobenzaldehído **1** y clorhidrato de hidrazina, este intermediario se sometió a reducción catalítica con Pd y atmósfera de hidrógeno para reducir los grupos nitro y así obtener **3**. El siguiente paso se basa en hacer reaccionar **3** con cloroformiato de etilo y generar el carbamato correspondiente **4**, por último se realizó el cierre intramolecular del anillo a través de la adición de hidruro al doble enlace de la imina, incrementando el carácter nucleofílico del nitrógeno que actúa sobre el grupo carbonilo del carbamato conduciendo a la formación del ciclo dihidroquinazolónico en rendimientos de (51%).



i) $\text{Cl}_2\text{N}_2\text{H}_6$, piridina. ii) Pd-C (10%), H_2 , MeOH. iii) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCl}$, piridina. iv) NaBH_4 , EtOH

Figura 10. Ruta de síntesis para la obtención del ciclo dihidroquinazolónico **5**.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

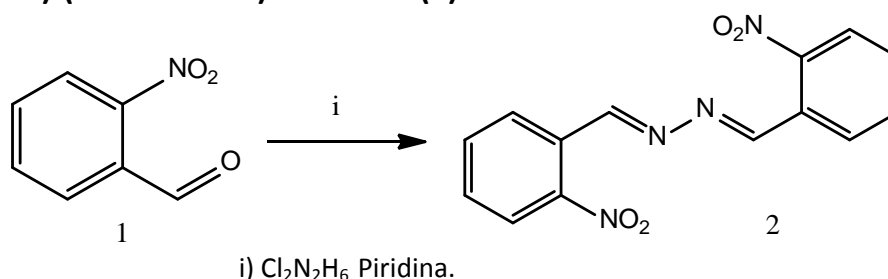
Se utilizaron matraces bola de 50 mL y 100 mL para realizar las reacciones propuestas, así como probetas graduadas de 25 mL y 50 mL, vasos de precipitados de 100 mL y 200 mL, barras magnéticas de agitación y columnas para realizar las purificaciones. Todos los disolventes orgánicos usados son grado técnico y antes de su uso fueron purificados por destilación fraccionada. Los reactivos químicos son grado analítico (Aldrich Co.) y fueron empleados sin purificar. La purificación de los intermediarios se realizó por cromatografía en columna empleando silica gel 60 (Merck Co, Damstadt Germany) como fase estacionaria y como fase móvil se empleo un sistema de elución hexano/acetato de etilo. Cada reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina (c.c.f) que después fue revelada con un sistema de luz UV.

5.1 EQUIPOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.

Para la caracterización por RMN se utilizó un equipo Varian de 300MHz modelo Mercury, y para la difracción de rayos X se utilizo un difractómetro Nonius Kappa equipado con detectores de área usando radiación de Mo ($\lambda_{MoK\alpha} = 0.71073 \text{ \AA}$).

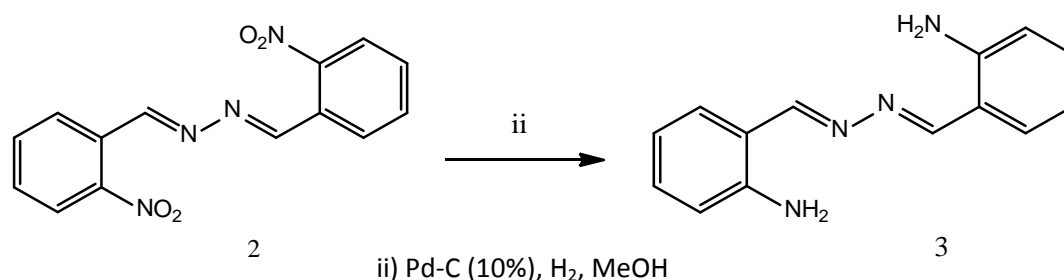
5.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.2.1 Bis-(1E,1'E)-(2-nitrobenzil)hidrazona (2)



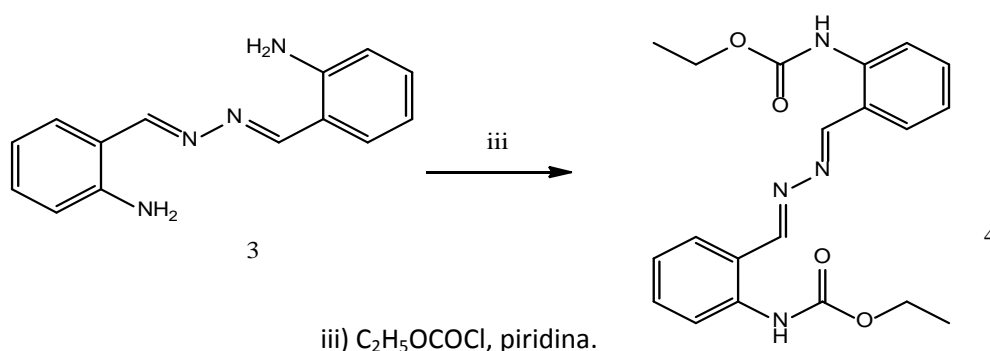
En un matraz bola de 50 mL se hace reaccionar 2-nitrobenzaldehído (0.5g, 3.30 mmol) con clorhidrato de hidrazina (0.7g, 6.79 mmol) en 7 mL de piridina, la mezcla se coloca a reflujo en baño de aceite con una temperatura de 120°C durante 4 horas. Al finalizar el tiempo de reacción se evapora el disolvente usando rotavapor y se extrae el producto con diclorometano (3 x 30 mL) y agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se decanta y se concentra para obtener 0.82 g de un sólido amarillo **2** (rendimiento 83%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.65 (t, 2H, J1 = 6.6,), 7.75 (t, 2H, J1 = 6.6,), 8.1 (d, 2H, J = 8.1), 8.29 (d, 2H, J = 1.5), 9.13 (s, 2H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 124.80, 128.67, 129.60, 131.27, 133.60, 157.82, 158.51.

5.2.2 Bis-(1E,1'E)-(2-aminobencil)hidrazona (3)



En un matraz bola de 50 mL se coloca el intermediario **2** (0.4 g, 1.34 mmol) y se disuelve en 7 mL de etanol, la mezcla se coloca en agitación por 5 minutos, al finalizar el tiempo de agitación se adiciona paladio en carbón activado al 10% como catalizador (30 mg). La reacción se agita toda la noche bajo una atmósfera de hidrógeno generada a través de un sistema compuesto por un globo y una jeringa. Se recibe la reacción en una columna empacada con celita usando metanol como sistema de elución, se recibe un volumen de 150 mL de metanol. El producto se concentra usando rotavapor para obtener así 0.31 g del intermediario **3**, un líquido oleoso color marrón (rendimiento 97%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.21 (s, 4H), 6.72 (m, 4H), 7.19 (t, 2H, J = 1.5), 7.25 (d, 2H), 8.72 (s, 2H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 114.95, 115.44, 115.54, 131.90, 134.08, 149.49, 164.32.

5.2.3 Bis-(1E,1'E)-(2-etilcarbamato benzil)hidrazona (4)

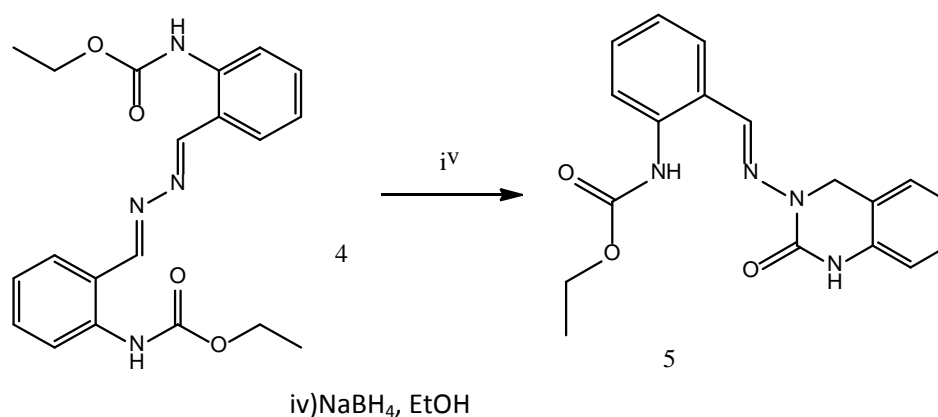


En un matraz bola de 50 mL se coloca el intermediario **3** (0.7 g, 2.93 mmol) junto con 7 mL de piridina, la mezcla se agita durante 10 minutos y se le agrega cloroformiato de etilo (1.58 g, 14.65 mmol), la reacción se coloca a reflujo en baño de aceite con una temperatura de 120°C durante 6 horas. Finalizado el tiempo de reacción se evapora el disolvente usando rotavapor y el producto se solubiliza con metanol; se deja cristalizar por evaporación lenta a 42°C durante 2 días y los

cristales resultantes se lavan con etanol hasta obtener un producto cristalino color amarillo de tamaño medio, los cristales se secan para obtener 0.92 g del intermediario **4** (rendimiento 82%).

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.38 (t, 6H, $J = 7.2$), 4.29 (q, 4H, $J = 7.1$), 7.11 (t, 2H, $J_1 = 6.3$), 7.46 (t, 2H, $J_1 = 2.1$), 7.48 (d, 2H, $J = 6.9$), 8.48 (d, 2H, $J = 8.1$), 8.73 (s, 2H), 11.21 (s, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 14.66, 61.17, 118.41, 118.51, 121.92, 132.63, 134.14, 140.16, 154.00, 165.14.

5.2.4 3-(2-etilcarbamato-benzilimina)hidroquinazolona (**5**)



En un matraz bola de 100 mL se coloca el intermediario **4** (0.7 g, 1.83mmol) en etanol (10 mL), y la mezcla se agita vigorosamente durante 10 minutos hasta que se ha disuelto la mayor parte del intermediario. Se coloca la reacción en un baño de agua fría y se le adiciona borohidruro de sodio (2.42 g, 64 mmol) con cuidado y en agitación, cuando se completa la adición se coloca la reacción a reflujo en un baño de aceite con una temperatura de 100°C durante 8 horas. Se le añade a la mezcla una solución de ácido cítrico al 10% (15 mL) y se evapora el disolvente usando rotavapor, se ajusta el pH de la mezcla a 10 con una solución de hidróxido de sodio 3M (1-1.5 mL) y se extrae con diclorometano (3x25 mL), la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra en rotavapor.

El producto se purifica por cromatografía en columna empleando silica gel como fase estacionaria y como eluyentes hexano/acetato de etilo (9:1,8:2 y 7:3), se recupera 0.32 g del intermediario **5** (rendimiento 51%, rendimiento global 33%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$), 4.13 (q, 2H, $J = 7.1$), 4.92 (s, 1H), 6.86 (d, 1H, $J = 7.8$), 6.96 (t, 1H, $J_1 = 6.3$), 7.10 (t, 1H, $J_1 = 7.5$), 7.20 (t, 1H, $J_1 = 3.6$), 7.23 (d, 1H, $J = 2.4$), 7.34 (t, 1H, $J_1 = 8.7$), 7.57 (d, 1H, $J = 8.1$), 8.08 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, $J = 8.7$), 9.92 (s, 1H), 11.3 (s, 1H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 14.79, 46.85, 60.86, 114.33, 116.78, 119.05, 121.49, 122.10, 122.56, 126.74, 128.68, 130.17, 132.21, 135.83, 137.97, 142.58, 149.45, 154.26.

6. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La hidroquinazolona sustituida **5** fue preparada de acuerdo al esquema general que inició con la reacción de dimerización entre el 2-nitro benzaldehído y el clorhidrato de hidrazina generando el intermediario **2** en rendimiento cuantitativo (83%). El espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H en CDCl_3 para este intermediario (Figura 11) muestra a frecuencia alta en δ 7.65 ppm una señal triple que integra para 2 H, correspondientes a los hidrógenos en posición 4 y 4' en la molécula, en 7.75 ppm se observa una señal triple que integra para 2 H que corresponden a los hidrógenos en posición 5 y 5'. En 8.1 y 8.29 ppm se observan dos dobles que integran para 2 H cada uno, que corresponden a los hidrógenos en posición 6, 6' y 3, 3', respectivamente, por último en 9.13 ppm se observa una señal simple que integra para 2 H, que corresponde a los hidrógenos alifáticos en posición 7 y 7'. Se puede observar claramente en el espectro la inexistencia de una señal simple en campo alto en δ 10.43 característica de aldehídos, constatando la ausencia de materia prima¹⁷.

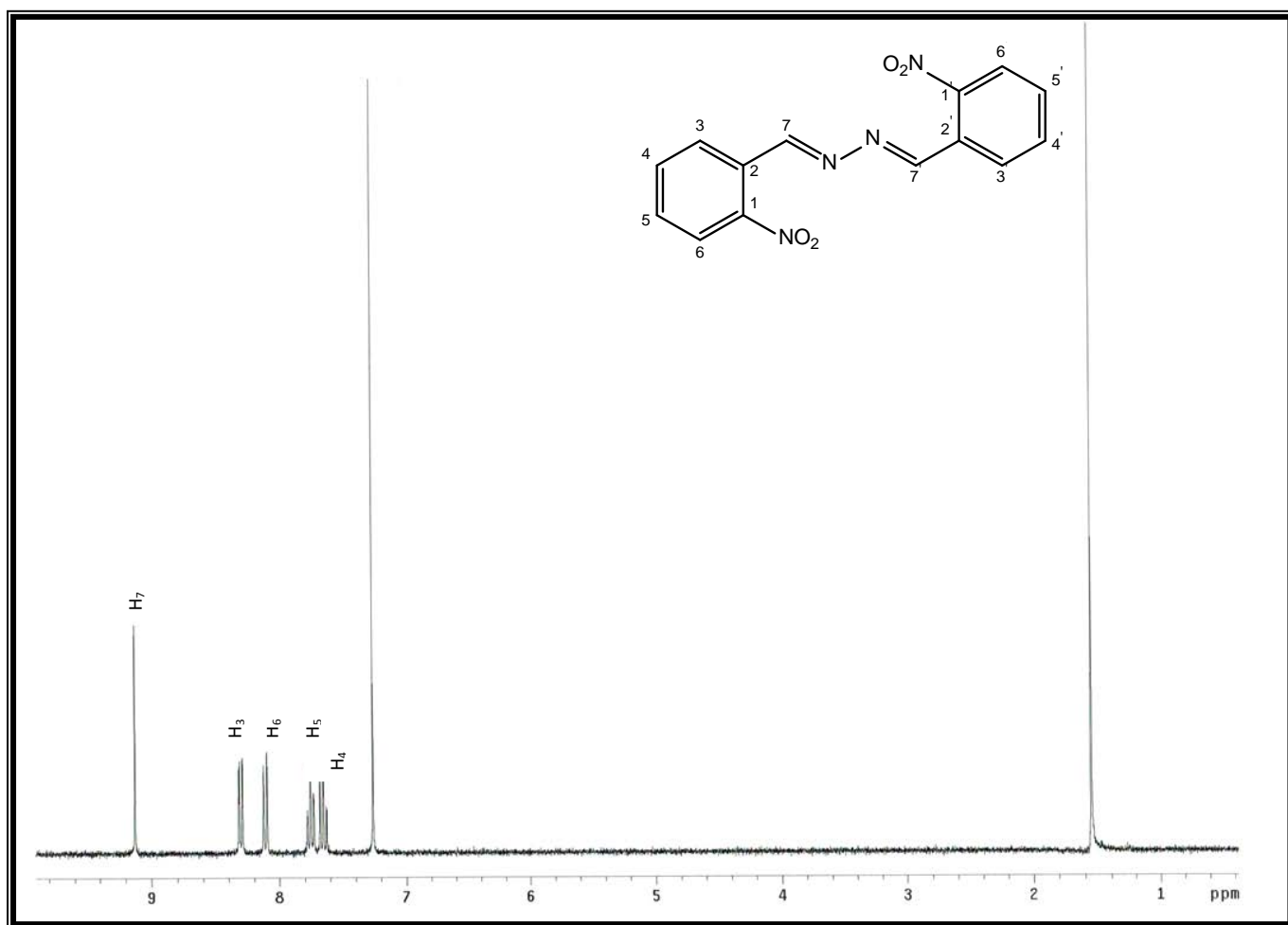


Figura 11. Espectro de RMN ^1H para el intermediario **2** en CDCl_3 .

El espectro de RMN ^{13}C para el intermediario **2** en CDCl_3 (Figura 12) muestra señales δ 124.80, 128.67, 129.59, 131.56, 133.59, 157.82, 158.51 ppm, correspondientes a las carbonos C2 y C2', C4 y C4', C6 y C6', C3 y C3', C5 y C5', C7 y C7' así como C1 y C1' respectivamente.

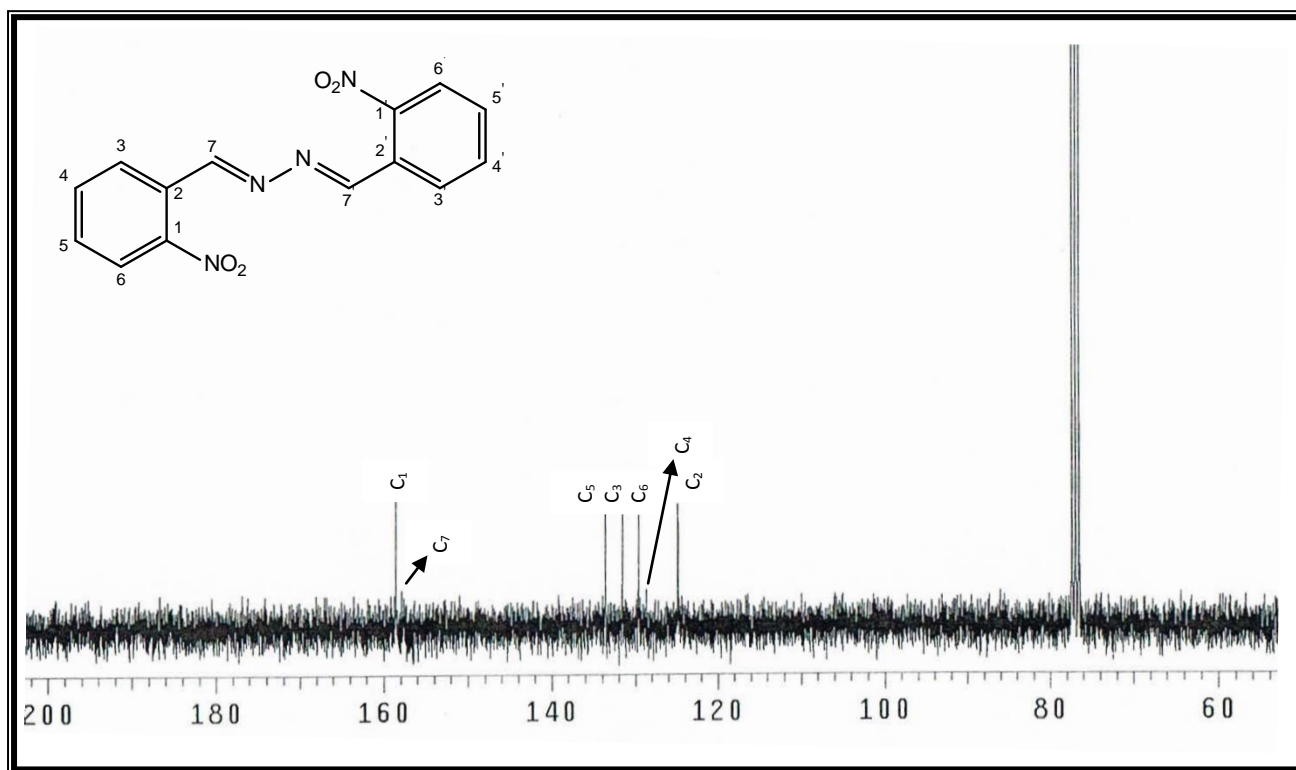


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C para el intermediario **2** en CDCl_3 .

La reacción prosiguió con la hidrogenación catalítica de la Bis-(1E,1'E)-(2-aminobencil)hidrazona **2** mediante el uso de una atmósfera de hidrógeno y paladio en carbón activado, culminando en la generación de Bis(2-aminobenzil)hidrazona **3** con un rendimiento del 97%. El espectro de RMN ^1H en CDCl_3 para este intermediario (Figura 13), muestra a frecuencia alta en δ 6.21 ppm una señal simple que integra para 4 H, correspondientes a los hidrógenos en el grupo amino; en 6.72 ppm se observa una señal múltiple que integra para 4 H, generada por dos señales aromáticas de la molécula, una señal doble para los hidrógenos en C6 y C6' y una triple para los hidrógenos en C4 y C4' que se superponen debido al efecto de apantallamiento generado por el ahora formado grupo amino, que lleva las señales a campo bajo y en este caso las sobrepone. En 7.19 ppm se observa una señal triple que integra para 2 H correspondientes a los hidrógenos en C5 y C5', y en 7.25 se observa una señal doble que integra para 2 H que corresponden a los hidrógenos en C3 y C3', esta señal se ve atenuada y es difícil de observar debido a que el solvente (CDCl_3) tiene una señal característica justo en este desplazamiento químico, por último en 8.72 ppm se observa una señal simple que integra para 2H correspondientes a los hidrógenos en C7 y C7'.

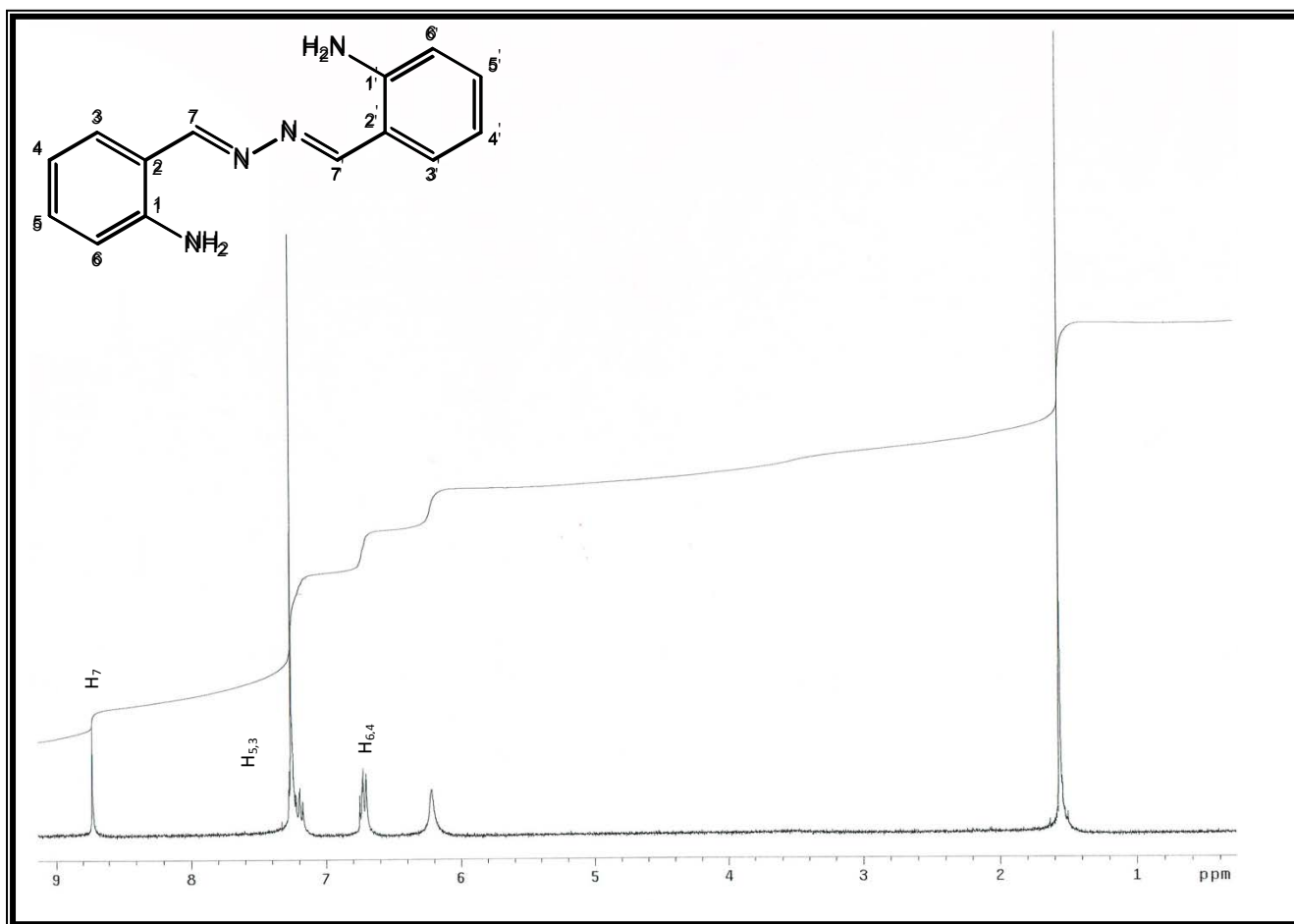


Figura 13. Espectro de RMN ^1H para el intermediario **3** en CDCl_3 .

La Figura 14 muestra un espectro de resonancia ^1H en DMSO-d_6 del intermediario **3** donde se aprecian las señales de la molécula que no logran observarse por el efecto del CDCl_3 , a frecuencia alta, en δ 6.56 ppm, se observa una señal triple que integra para 2H correspondiente a los hidrógenos en C4 y C4' e inmediatamente en 6.74 ppm una señal doble que integra para 2H correspondiente a los hidrógenos en C6 y C6'. En 7.12 y 7.31 ppm se observan dos señales, una triple y una doble, ambas integrando para 2H correspondientes a los hidrógenos en C5 y C5' y C3 y C3' respectivamente, y por último en 8.77 ppm se observa una señal simple que integra para 2H correspondientes a los hidrógenos en C7 y C7'. Las señales que se describen para el espectro de RMN en DMSO-d_6 no son las mismas que las descritas para el espectro en CDCl_3 , ésto debido al efecto del disolvente, en particular en este caso, el DMSO-d_6 separa las señales y las lleva a campo alto, este efecto se ha descrito anteriormente y el rango de movimiento de las señales entra en el característico cuando se compara CDCl_3 y DMSO-d_6 ¹⁸.

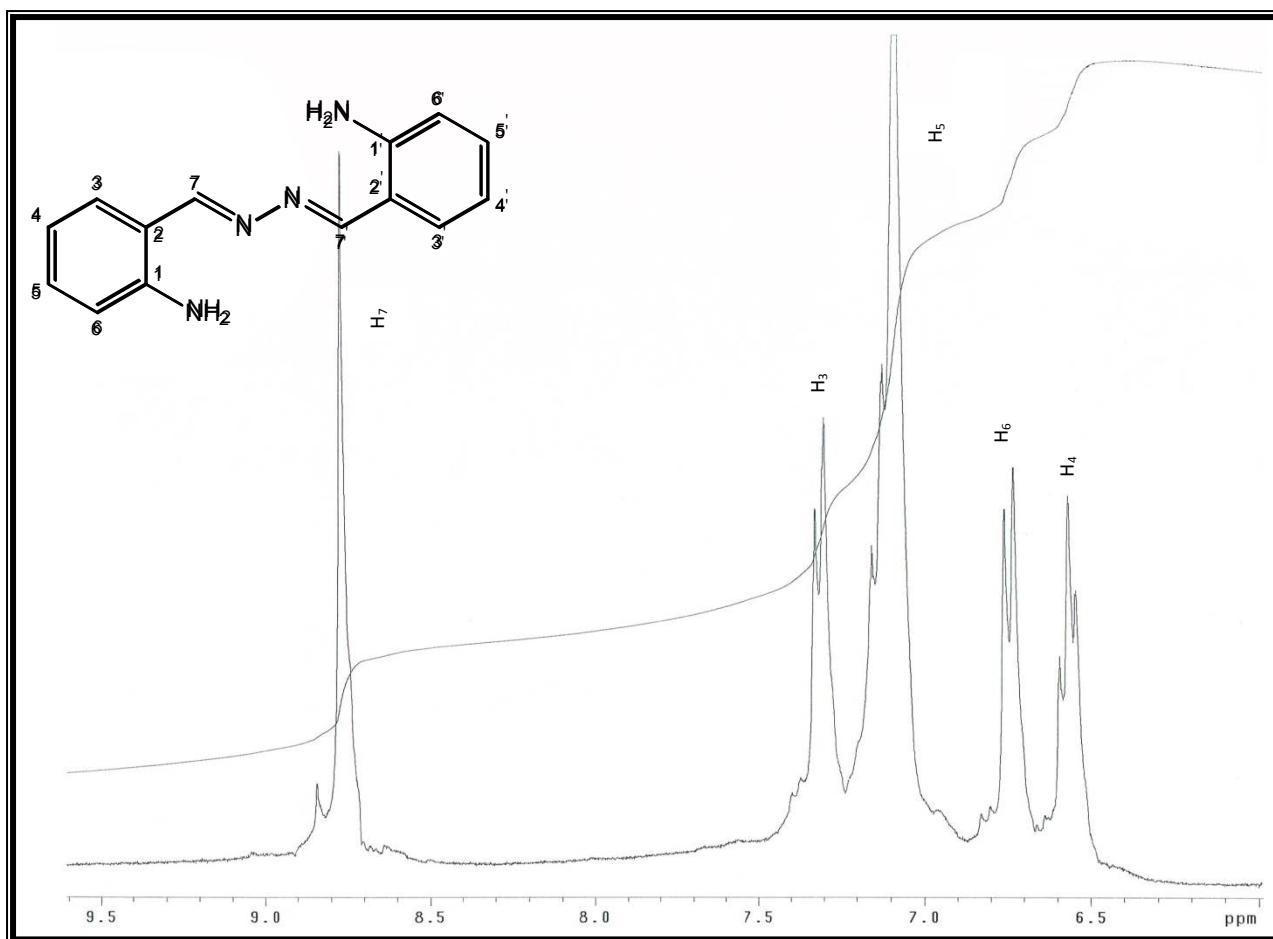


Figura 14. Espectro de RMN ^1H para el intermediario 3 en DMSO-d6.

El espectro de RMN ^{13}C para el intermediario 3 en DMSO-d6 (Figura 15) muestra señales en δ 114.95, 115.44, 115.54, 131.90, 134.08, 149.49 y 164.32 ppm correspondientes para C2 y C2', C4 y C4', C6 y C6', C3 y C3', C5 y C5', C7 y C7' así como para C1 y C1', respectivamente.

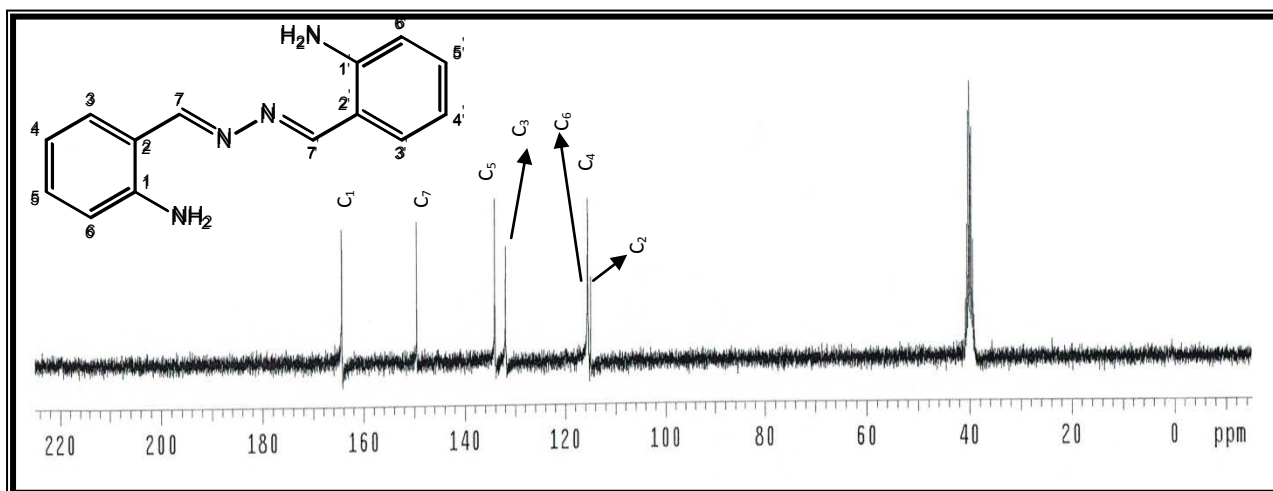


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C para el intermediario 3 en DMSO-d6.

El siguiente paso consistió en la reacción de la Bis(2-aminobenzil)hidrazona **3** con cloroformiato de etilo en piridina, generando Bis(2-etilcarbamatobenzil)hidrazona **4**, con un rendimiento del 82%. El espectro de RMN ^1H en CDCl_3 para este intermediario (Figura 16), indica a frecuencia baja en δ 1.38 ppm una señal triple que integra para 6 H y en 4.29 ppm un cuarteto que integra para 4 H correspondientes al grupo etilo y a los hidrógenos en posición 10, 10' y 9, 9', respectivamente. A su vez en 7.11 y 7.46 ppm se observan dos señales triples que integran para 2 H cada una correspondientes a las posiciones 4 y 4', y 5, 5'. En 7.48 y 8.48 ppm el espectro muestra dos señales dobles correspondientes a las posiciones 6, 6', y 3, 3', que integran para 2 H cada una, y por último en 8.73 y 11.21 ppm, se muestran dos señales simples, ambas integran para 2 H, la primera de ellas corresponde al hidrógeno alifático en posición 7, 7', y la segunda corresponde a la señal del hidrógeno unido al nitrógeno del grupo carbamato.

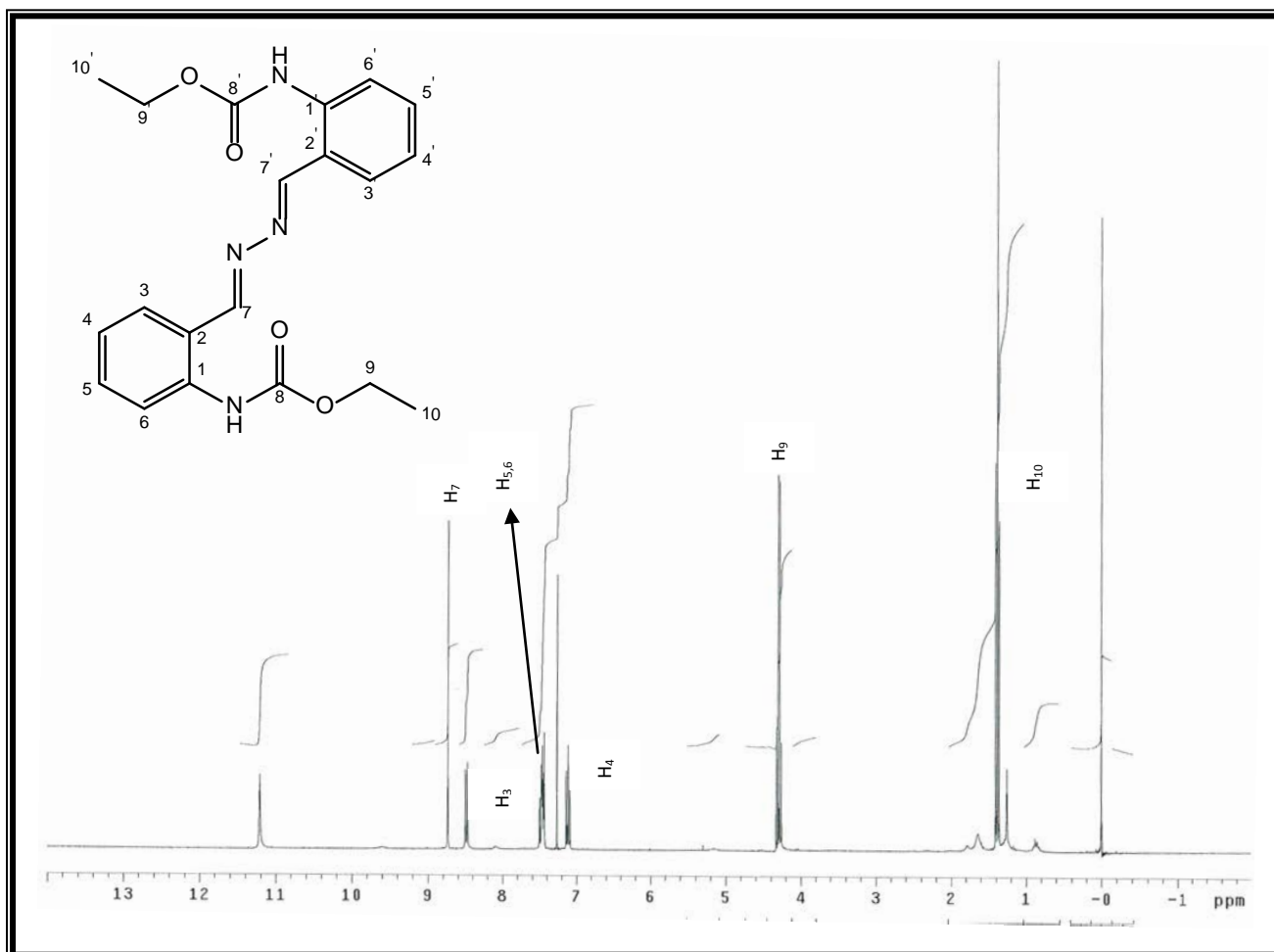


Figura 16. Espectro de RMN ^1H para el intermediario **4** en CDCl_3 .

El espectro de RMN ^{13}C en CDCl_3 para el intermediario **4** (Figura 17) muestra señales en la región alifática en δ 14.66 y 61.77 ppm, para los carbonos del grupo etilo, C_9 , C_9' y C_{10} , C_{10}' , en el carbamato. En 118.41, 118.55, 121.92, 132.63, 134.14 y 140.16 ppm se muestran señales correspondientes para C_2 , C_6 , C_4 , C_3 , C_5 y C_1 , y los respectivos C_2' , C_6' , C_4' , C_3' , C_5' y C_1' , de los anillos bencénicos a ambos lados de la molécula, a su vez, en 154.00 y 165.14 ppm, se muestran señales para los carbonos alifáticos C_7 , C_7' y C_8 , C_8' , esta última señal es característica de carbonos en grupos carbonilo.

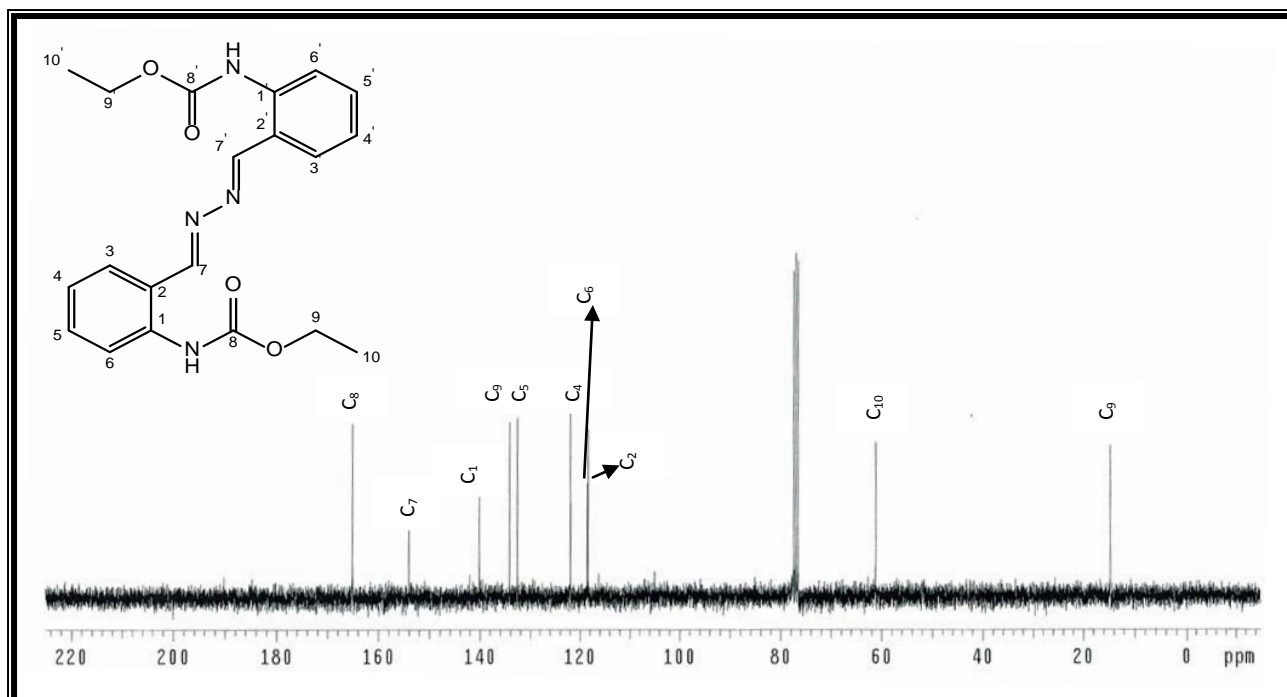


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C para el intermediario **4** en CDCl_3 .

El paso final de reacción para obtener 3-(2-etilcarbamato benzilimina)hidroquinazolona **5** a partir de Bis(2-etilcarbamato benzil)hidrazona **4**, en rendimiento del 51%, se realizó colocando el intermediario **4** en etanol y agregando NaBH_4 con agitación moderada. El espectro de RMN ^1H en DMSO-d_6 (Figura 18) muestra a frecuencia baja en δ 1.22 ppm una señal triple que integra para 3H y en 4.13 ppm un cuarteto que integra para 2H, correspondientes al grupo etilo y a los hidrógenos en posición $9'$ y $10'$, a su vez en 4.92 ppm se observa un simple que integra para 2H correspondiente al hidrógeno en posición 4. Avanzando a frecuencia alta en 6.86 y 6.96 ppm, se observa una señal doble y una triple, ambas integrando para 1H en posición 5 y 7 del anillo cíclico, en 7.10, 7.20, 7.23, y 7.34 ppm, se observan una serie de señales triples, a excepción de la señal en 7.23 ppm que es una doble y que se encuentra cercana a la señal triple en 7.20 ppm ocasionando el efecto de superposición observado en el espectro, estas señales corresponden a las posiciones

6', 6, 8 y 4'. En 7.57 ppm podemos observar una señal doble que integra para 1H correspondiente a la posición 7', a su vez en 8.08 y 8.24 ppm, podemos observar una señal simple y una doble ambas integrando para 1H correspondientes a las posiciones 1' y 4', respectivamente, estas son las últimas señales correspondientes a hidrógenos en enlaces C-H; a frecuencia alta, en 9.92 y 11.30 ppm, se observan dos señales simples que integran para 1H, correspondientes a las posiciones 1 y al H en el enlace N-H, del grupo carbamato en la sección no cíclica de la molécula.

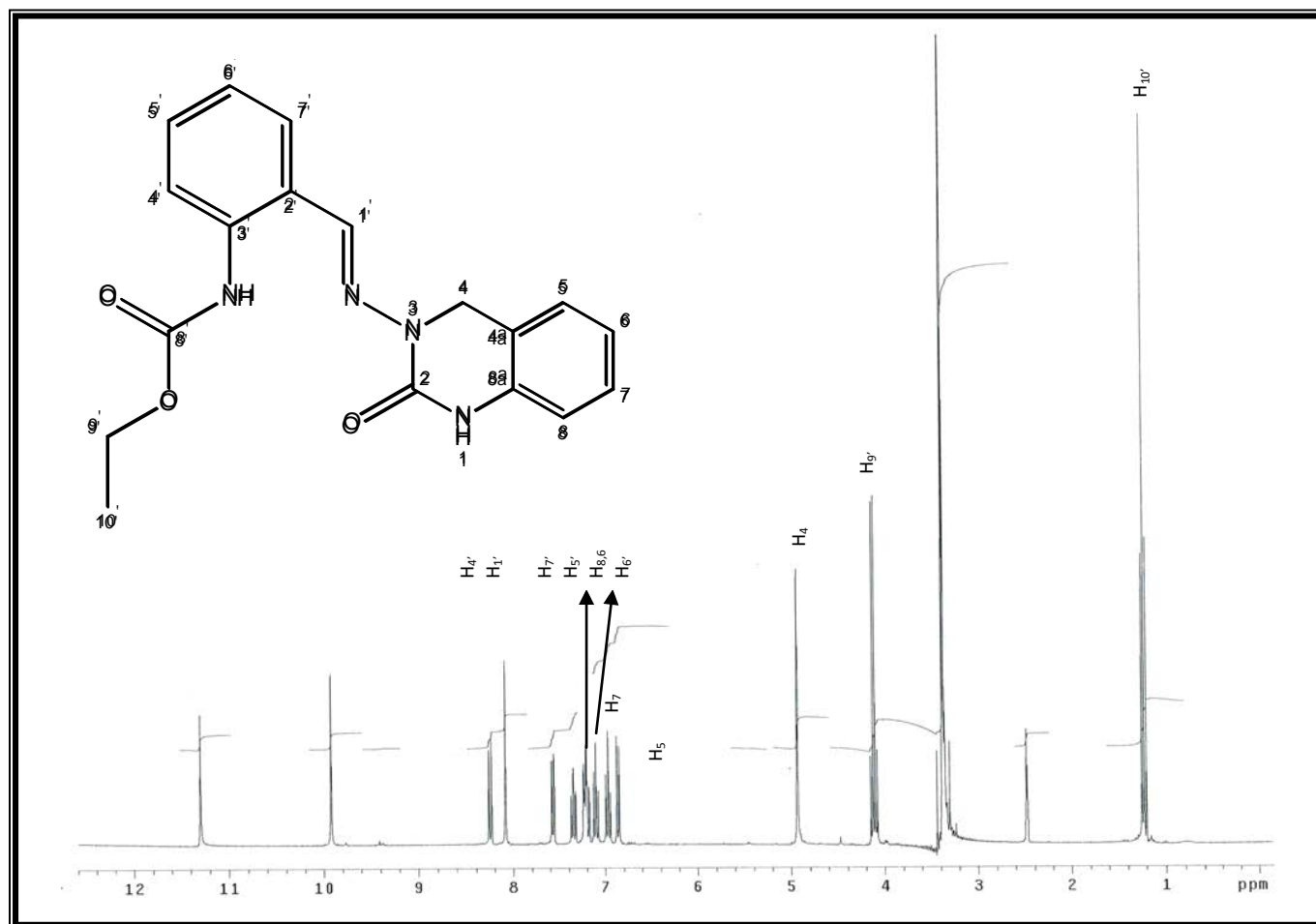


Figura 18. Espectro de RMN ^1H para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO- d_6 .

El espectro de RMN ^{13}C para el producto final (Figura 19) muestra tres señales en la región alifática en δ 14.79, 46.79 y 60.86 ppm, la señal a 46.79 ppm corresponde al carbono en posición 4 dentro del ciclo, y las señales restantes corresponden a los carbonos en el grupo carbamato de la molécula en posiciones 9' y 10'; a frecuencia alta se observan señales para los carbonos aromáticos en 114.33 (C8), 116.78 (C4'), 119.05 (C3'), 121.49 (C6'), 122.10 (C6), 122.56 (C5), 126.74 (C7), 128.68 (C7'), 130.17 (C5'), 132.21 (C8a), 135.83 (C5a), 137.97 (C2') y 142.58 (C1'). Por último se observan dos señales características de grupo carbonilo a 149.45 y 154.26 ppm, correspondientes para los carbonos en posición C2 y C8', respectivamente

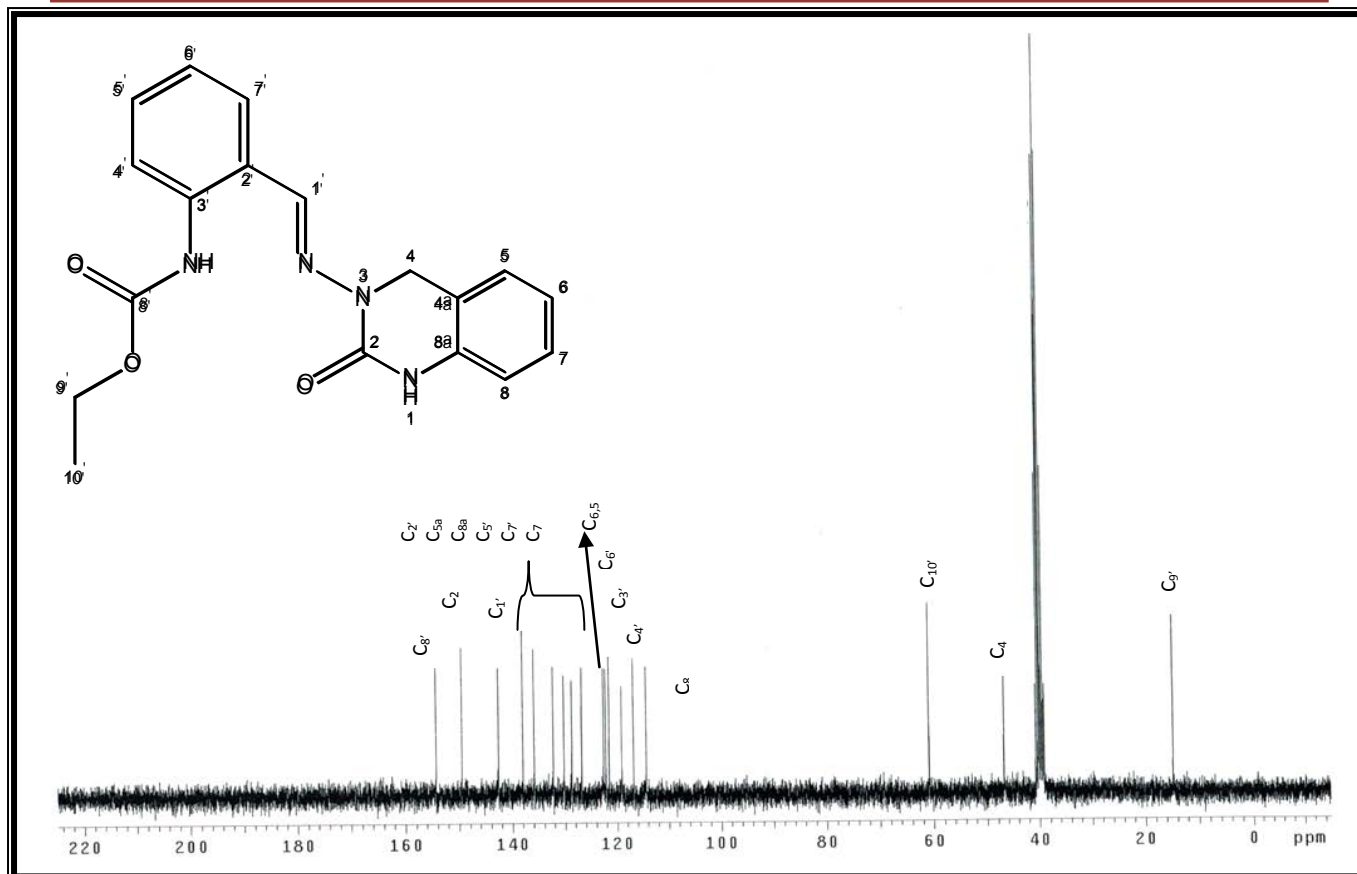


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO- d_6 .

El espectro de RMN ^1H bidimensional, COSY (Figura 20), muestra una interacción a tres enlaces entre las señales en δ 1.22 y 4.13 ppm, correspondientes al grupo etilo en la sección no cíclica de la molécula. Las señales en 6.86 y 7.20 ppm, indicadas en la sección aumentada del espectro (Figura 21), muestran una interacción correspondiente a los hidrógenos en posición 5 y 6 así como una interacción en 6.96 y 7.20 ppm correspondientes a los hidrógenos en posición 6 y 7 en la molécula; las señales en 6.96 y 7.23 ppm muestran una interacción a tres enlaces, correspondientes a los hidrógenos en posición 7 y 8. El espectro muestra una interacción entre las señales en 7.10 y 7.34 ppm, correspondientes a los hidrógenos en posición 6' y 5' en la región no cíclica de la molécula, de igual forma, la señal en 7.10 ppm, presenta una interacción con la señal en 7.57 ppm correspondientes a los hidrógenos en posición 6' y 7'; se muestra también una interacción entre las señales en 7.34 y 8.24 ppm, correspondientes a los hidrógenos en posición 5' y 4'.

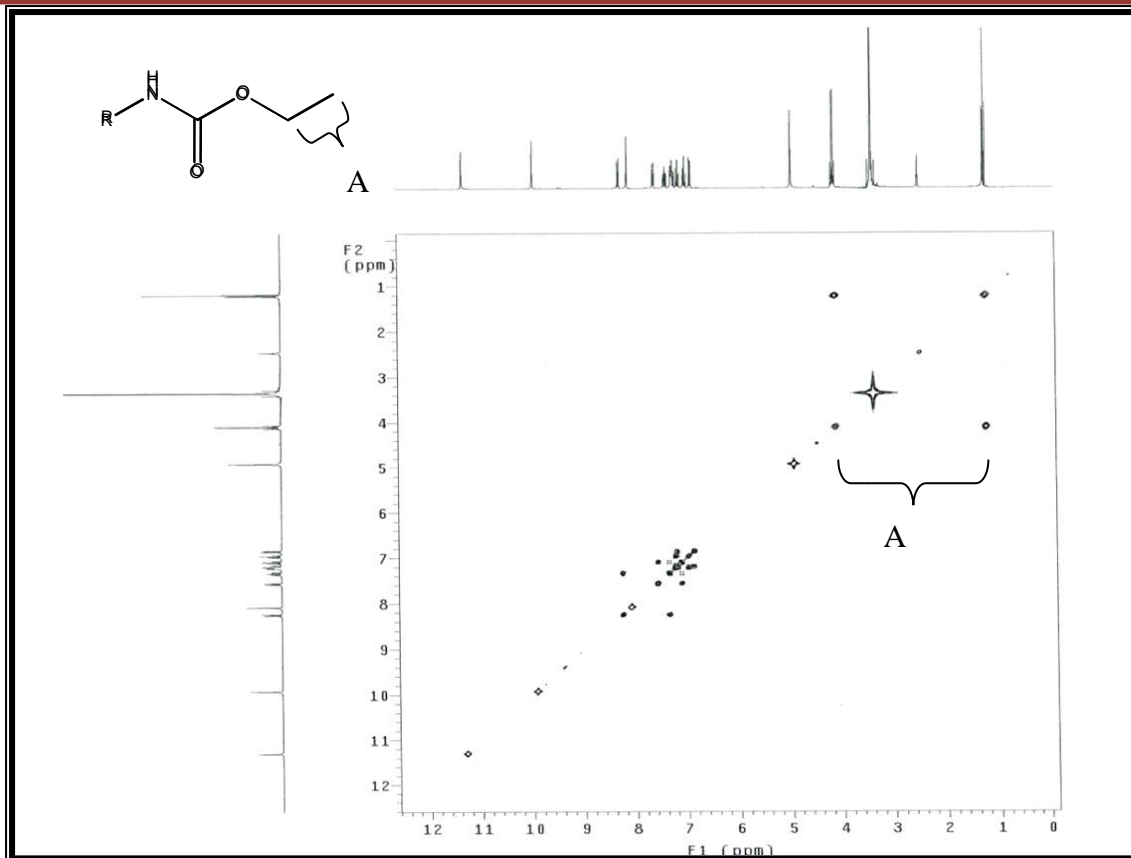


Figura 20. Espectro de RMN ^1H bidimensional para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d6.

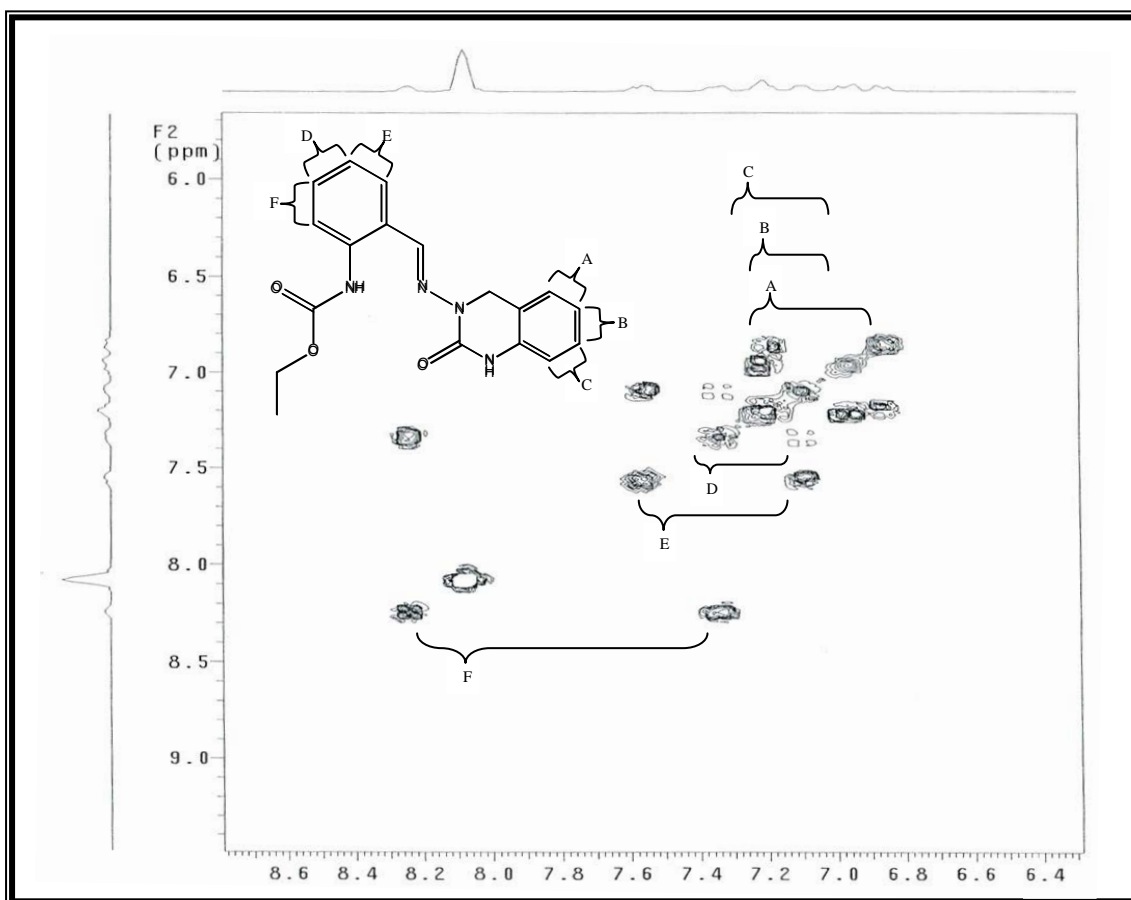


Figura 21. Espectro de RMN ^1H bidimensional aumentado para el ciclo hidroquinazolónico en DMSO-d6.

La datos de la difracción de rayos X para el ciclo hidroquinazolónico (Figura 22), que se obtuvo a partir de una muestra concentrada que se colocó a evaporación lenta con DMSO-d6 como solvente, fueron recogidos en un difractómetro Nonius Kappa a 273 (2) K, equipado con detectores de área usando radiación de Mo ($\lambda_{MoK\alpha} = 0.71073 \text{ \AA}$). El resumen de los datos de cristal y la colección de parámetros están enlistados en la Tabla 1 del Anexo 1. La estructura fue resuelta por métodos directos usando SHELXS97 en el paquete Win GX. El refinamiento final se realizó por métodos de matriz completa de mínimos cuadrados en F^2 con SHELXL97. Los átomos de H en C, N y O fueron posicionados geoméricamente y tratados como átomos rígidos, con C-H = 0.93 – 0.98 \AA , y con Uiso (H) = 1.2 Ueq (C,N,O). El programa Mercury fue usado para la visualización, gráficos moleculares y el análisis de las estructuras cristalinas. El software usado para preparar el material de publicación fue PLATON.

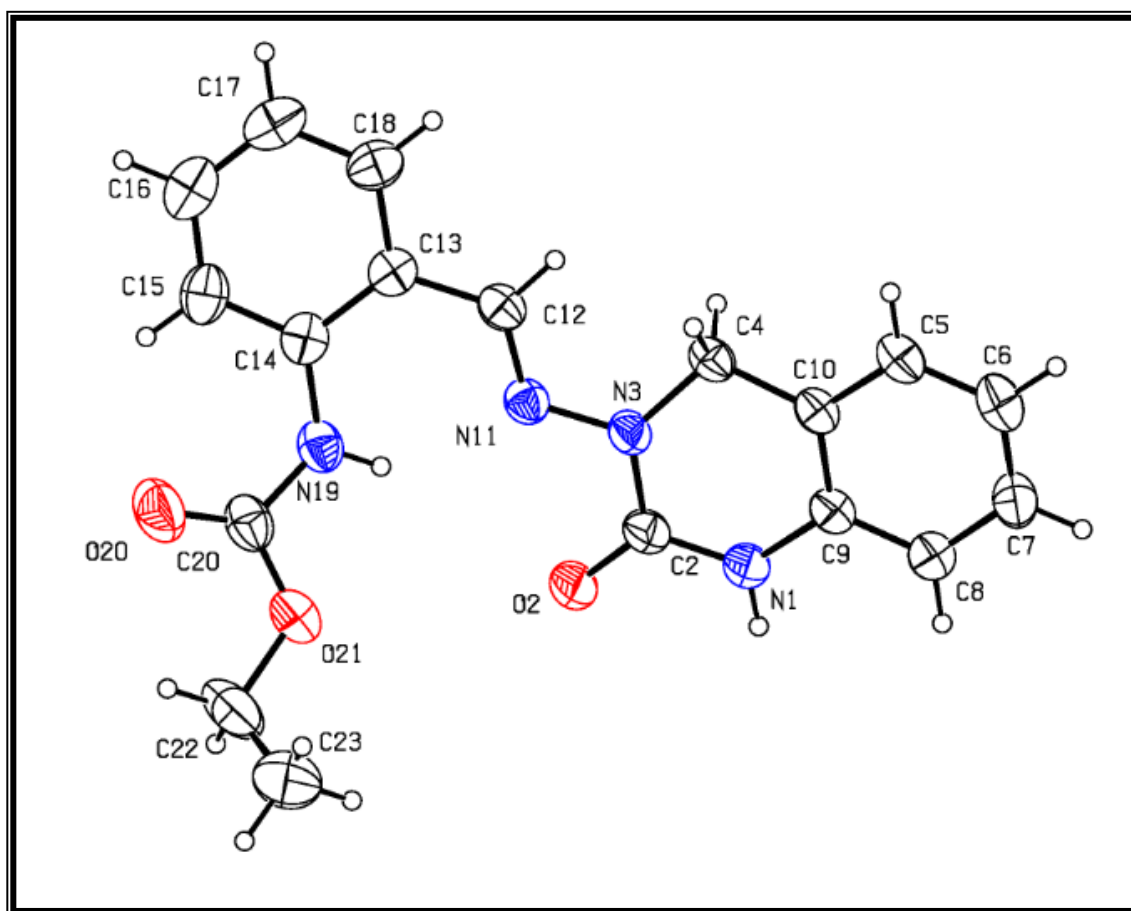


Figura 22. Diagrama ortep para el ciclo hidroquinazolónico.

El heterociclo hidroquinazolónico muestra una conformación semi-oblicua con parámetros de puckering¹⁹ de $Q = 0.1254 \text{ \AA}$, $\theta = 64.09^\circ$ y $\varphi = 178.9855$, si el cálculo comienza desde C1 a C8a, con todos los parámetros asimétricos menores a $18.33 (1)^\circ$. Se tiene además un ángulo de torsión

promedio ponderado de $7.94 (0.206)^\circ$ y una distancia promedio de enlace del anillo ponderado de $1.4071 (0.222) \text{ \AA}$. En la estructura cristalina podemos encontrar interacciones intermoleculares N-H..O de tipo puente de hidrógeno, como la existente en N1-H1..O2 (numeración cristalográfica) ($2.8328 (2) \text{ \AA}$: $1-x, -y, -z$); así mismo, se pueden encontrar interacciones intramoleculares N-H..N de tipo puente de hidrógeno, como la existente en N19-H19..N11 (numeración cristalográfica) (Figura 23).

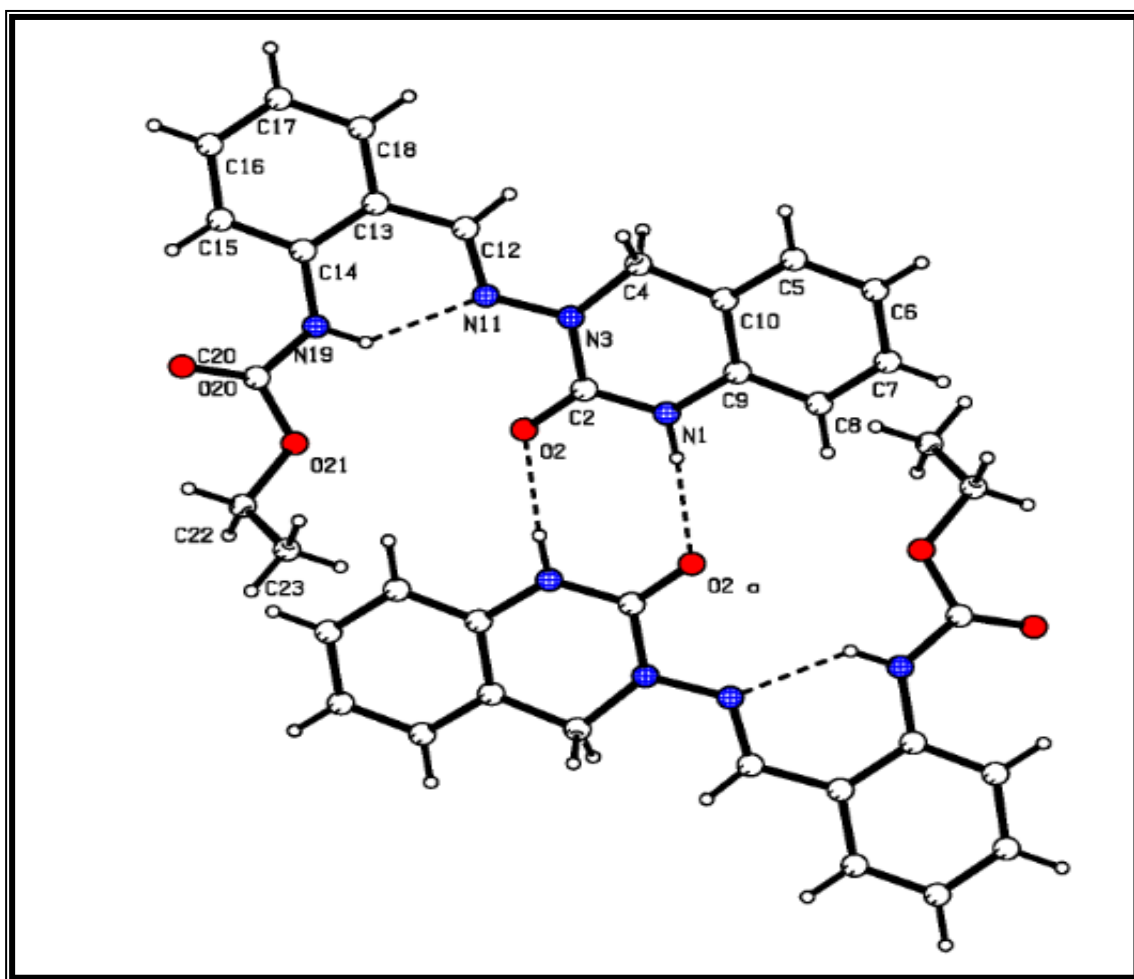


Figura 23. Representación del ciclo hidroquinazolónico donde se muestran las interacciones intermoleculares e intramoleculares .

Los parámetros de la celda unitaria para la cristalografía del intermediario **5** (Figura 24) son $a = 7.5046 (3) \text{ \AA}$, $b = 20.7529 (11) \text{ \AA}$ y $c = 11.1743 (4) \text{ \AA}$, con $\alpha = 90.000 (0)^\circ$, $\beta = 97.890 (3)^\circ$ y $\gamma = 90.000 (0)^\circ$, generando así un sistema cristalino monoclinico.

Por último, Las distancias que existen entre los átomos que integran el heterociclo y el ángulo de enlace son los esperados para una molécula de estas características²⁰ (Tabla 2 y 3 del Anexo 1).

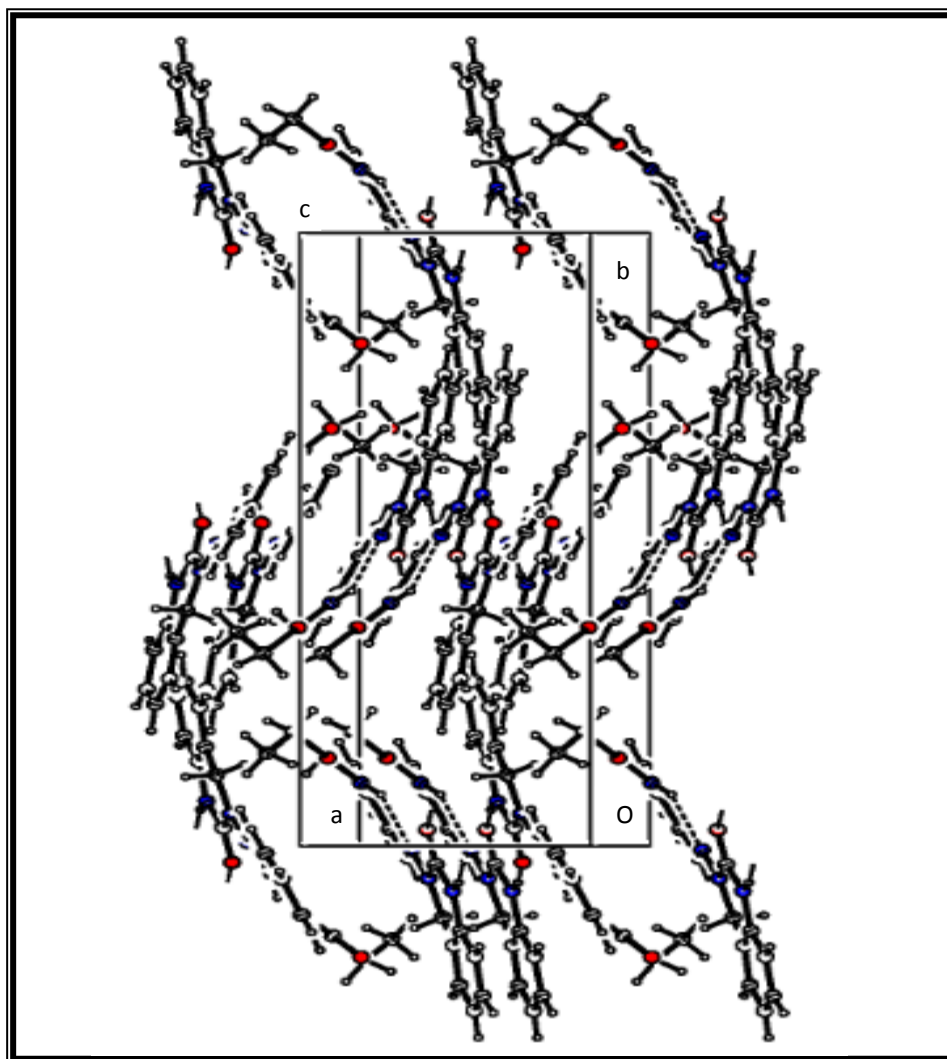


Figura 24. Representación de la celda unitaria para el ciclo hidroquinazolónico.

La reacción final que conlleva a la formación del ciclo hidroquinazolónico muestra en una cromatografía de capa fina solo dos manchas aparentes, una coincidente con la materia prima para la reacción (Intermediario **4**), y una más perteneciente al producto de la reacción **5**; a pesar de que la reacción tiene un número de hidruros equivalentes en proporción 1:30 con relación al intermediario **4** la reacción no concluye con la formación de ambos heterociclos debido a que la formación del segundo heterociclo está condicionado al ataque nucleofílico por parte del nitrógeno restante adyacente al ciclo hidroquinazolónico que no puede concluirse por el impedimento estérico y electrónico que se genera con la formación del primer heterociclo y que se pueden inferir de la Figura 22, además, la molécula no puede girar sobre el eje del C1' para finalizar la reacción del segundo heterociclo por el efecto de rigidez ocasionado por la hibridación sp^2 del carbono.

Con la estructura de la molécula definida a partir de la difracción de rayos X se procedió a realizar una serie de aproximaciones *in silico* de la unión del ciclo hidroquinazolónico con enzimas clave del parásito, se escogieron dos principales, cruzaína y tripanotión reductasa, ambas han sido estudiadas previamente y se conoce el sitio en dónde los ligandos se unen con las enzimas y generan la inhibición.

Tripanotión reductasa tiene un sitio activo en cada monómero sobre el dominio III, se modificó la enzima para que sólo presentase un monómero y la interacción fuese llevada a cabo sobre este dominio, se eliminaron las moléculas de agua para evitar interacciones no correspondientes a la enzima. El docking molecular se llevo a cabo con Autodock vina²¹, y la visualización se llevo a cabo mediante DiscoveryStudio. Los parámetros para realizar el ensayo sobre el dominio III de la enzima son, la secuencia de aminoácidos es: Gly49-Cys52-Tyr110-Met113-His461-Thr463-Ser470; para las dimensión de la caja se tiene: X = 18, Y = 24 y Z = 24, con Xc = -13.861 Å, Yc = 21.194 Å y Zc = -28.833 Å, con un total de aproximaciones igual a 15. La Figura 25 muestra las aproximaciones entre el ciclo hidroquinazolónico y la enzima que presentan una conformación tridimensional del ciclo hidroquinazolónico que permite la interacción entre el ligando y la proteína, estas interacciones son, en su mayoría, de tipo puente de hidrogeno y en ocasiones de tipo $\pi - \pi$.

Cruzaína tiene solo un dominio catalítico, para el estudio se eliminaron las moléculas de agua para evitar interacciones no correspondientes a la enzima. El docking molecular se llevó a cabo de la misma forma que en el estudio anterior. Los parámetros para realizar el ensayo sobre la enzima son, la secuencia de aminoácidos es: Gln19Gly20-Gly23-Ser24-Cys25-Trp26-Thr59-Asp60-Ser61-Ser64-Gly66-Leu157-Asp158-His159-Gly160-Trp177; para la dimensión de la caja se tiene que: X = 30, Y = 20 y Z = 32, con Xc = 98.345 Å, Yc = 19.594 Å y Zc = -16.391 Å, con un total de aproximaciones igual a 15. En la Figura 26 se muestran los aproximaciones que presentaron interacciones entre el ciclo hidroquinazolónico y la enzima.

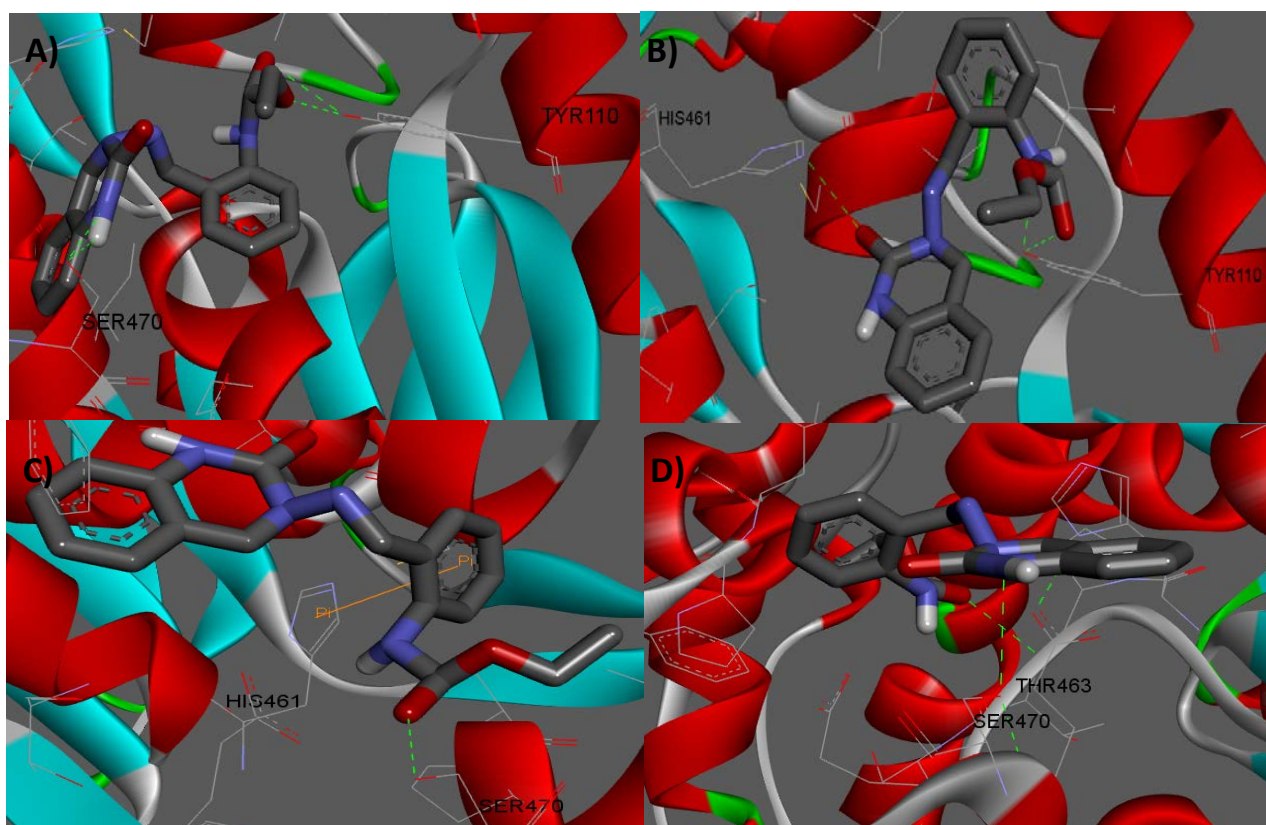


Figura 25. Representación del ciclo hidroquinazolónico con algunos residuos del sitio activo de Tripanotión reductasa

En A) la Figura 25 muestra dos interacciones tipo puente de hidrógeno entre el residuo de Tirosina en 110 ($O-H(Tyr)..O(C8')$, 3.207\AA) y ($O..O-H(Tyr)$, 3.051\AA) y dos interacciones entre el residuo de Serina en 470 ($O-H(Ser)..N1$, 3.154\AA) y ($N1-H..O(Ser)$, 2.422\AA). B) Muestra dos interacciones entre el nitrógeno y el oxígeno del carbonilo del grupo carbamato y la Tirosina en 110 ($O-H(Tyr)..N(C3')$, 2.982\AA) y ($O-H(Tyr)..O(C8')$, 3.152\AA) y una interacción entre $O(C2)$ y la Histidina 461 ($O(C2)..N(His)$, 2.961\AA), C) Muestra una interacción entre el oxígeno del carbonilo en el grupo carbamato y la Serina 470 y una interacción tipo $\pi - \pi$ del benceno no unido al heterociclo y el imidazol del residuo de Histidina en 461 (4.12\AA), así como una interacción entre el residuo de Ser en 470 y $O(C8')$, ($8(C8')..O-H(Ser)$, 2.974\AA). D) Muestra una interacción entre el $N1$ y el residuo de Serina en 470 ($O-H(Ser)..N1$, 3.172\AA) y una interacción entre el carbonilo del grupo carbamato y el residuo de Treonina en 463 ($N-H(Thr)..O(C8')$, 3.161). No se muestran todas las representaciones debido a que no todos presentaban interacción con algún átomo del heterociclo; de igual forma las interacciones mostrados no son todas aquellas que se presentan en la molécula, pueden existir interacciones de tipo electroestáticas y de Van der Waals entre el ciclo hidroquinazolónico y la enzima.

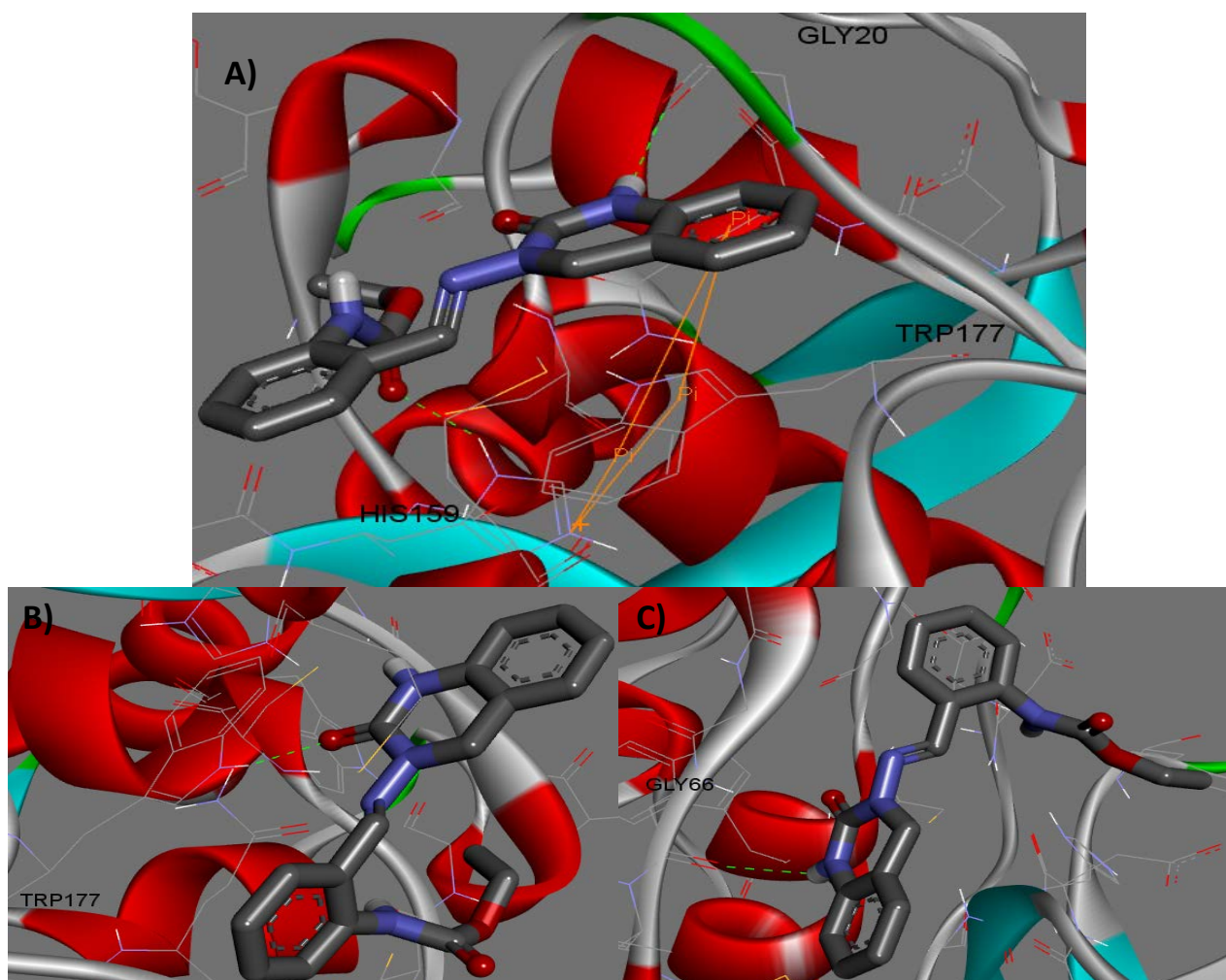


Figura 26. Representación del ciclo hidroquinazolónico con algunos residuos del sitio activo de Tripanotión reductasa Cruzaina (Cruzapaína)

En A) la Figura 26 muestra una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el H(N1) y el residuo de Glicina en posición 20 (N1-H..O(Gly), 2.225 Å), y otra interacción entre el oxígeno del carbonilo en el carbamato y el residuo de Histidina en 159 (N-H(His)..O(C8'), 2.137Å), además una interacción tipo $\pi - \pi$ entre el benceno unido al heterociclo, el indol del residuo de triptófano en 177 y el imidazol del residuo de Histidina en 159 (5.51,4.49 Å). B) Muestra una interacción entre el O2(C2) y el residuo de Triptófano en 177 (N-H(Trp)..O(C2), 2.098Å). C) Muestra una interacción de tipo puente de hidrógeno entre H(N1) y el residuo de Glicina en posición 66 (N1-H..O(Gly), 2.406Å)). Las interacciones que se muestran son solo aquellas que la conformación de la molécula genera una interacción entre el ciclo hidroquinazolónico y la enzima, en los ensayos que no se presentan se puede observar interacciones entre el grupo carbamato y la enzima, además, las interacciones mostradas únicamente son de tipo puente de hidrogeno pero entre las aproximaciones mostradas y las que no se muestran pueden existir interacciones de tipo electroestáticas y de Van der Waals entre el ciclo hidroquinazolónico y la enzima.

7. CONCLUSIONES

- Se realizaron las aproximaciones sintéticas de acuerdo al esquema propuesto y la caracterización estructural por RMN de ^1H y ^{13}C de los intermediarios y el producto final, así como la difracción de rayos X para el producto hidroquinazolónico **5**.
- Se generó una molécula hidroquinazolónica con sustituyentes sobre el N3 del heterociclo con posibilidades de ser activa contra parásitos.
- Se realizó el cierre del ciclo a través de una reacción que involucra al grupo carbamato y el ataque de un nitrógeno proveniente de la hidrazina.
- Se realizaron aproximaciones *in silico* entre el ciclo hidroquinazolónico y dos enzimas específicas del parásito mostrando interacciones entre el ciclo hidroquinazolónico y las enzimas.
- La metodología empleada permitirá el diseño de moléculas de naturaleza hidroquinazolónica con puntos que pueden ser funcionalizados para brindar o mejorar actividad farmacológica.

8. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

La síntesis del ciclo hidroquinazolónico es la primera aproximación para la generación de una nueva molécula contra la enfermedad de Chagas que puede combinarse con fármacos especializados para tener un mejor tratamiento *T. cruzi*, pero una sola molécula no es suficiente para poder ofrecer buenos resultados con respecto a la efectividad del ciclo y de su capacidad para poder eliminar el parásito del huésped; para poder obtener resultados de que el ciclo hidroquinazolónico es efectivo contra la enfermedad de Chagas pueden realizarse modificaciones al ciclo ya sintetizado o generar ciclos diferentes a partir del cambio de la molécula que reacciona con el intermediario **3** para formar el carbamato, de esta forma, la molécula puede funcionalizarse de acuerdo a las necesidades que se tienen con respecto a las diferentes dianas terapéuticas (enzimas) o de acuerdo con un diagrama de Craig.

La funcionalización del heterociclo puede realizarse entonces de la siguiente forma:

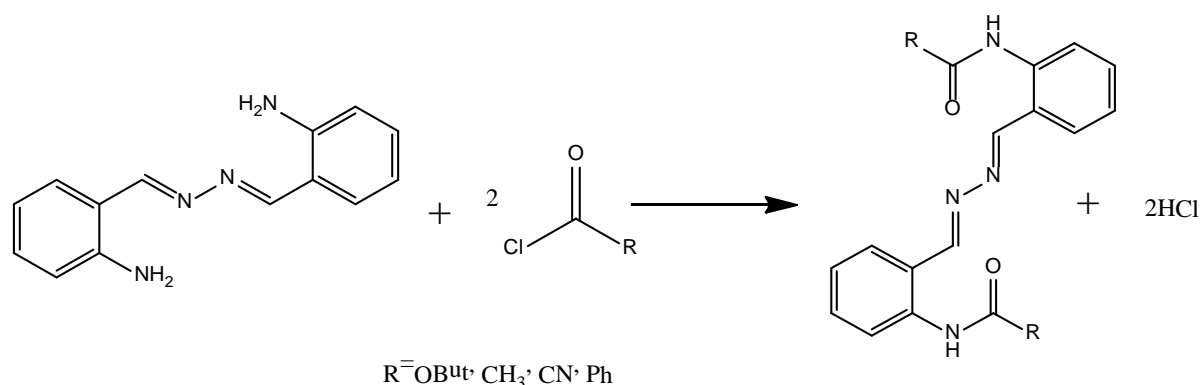


Figura 27. Funcionalización del ciclo hidroquinazolónico previo al cierre intramolecular.

De esta forma cuando se realice el cierre intramolecular del anillo se pueden generar diferentes sustituyentes para el ciclo y además conocer si se puede deshidratar el carbonilo para generar un ciclo hidroquinazolónico (Para el caso de $R = \text{CH}_3$ y Ph); de la misma forma el ciclo puede funcionalizarse una vez generado el anillo debido a que el grupo carbamato que no reacciona para generar el segundo ciclo puede desprotegerse liberando el grupo amino tal como en una reacción de desprotección para el grupo N-Boc, de esta forma el grupo amino puede reaccionar como nucleófilo y generar sustituyentes de la molécula.

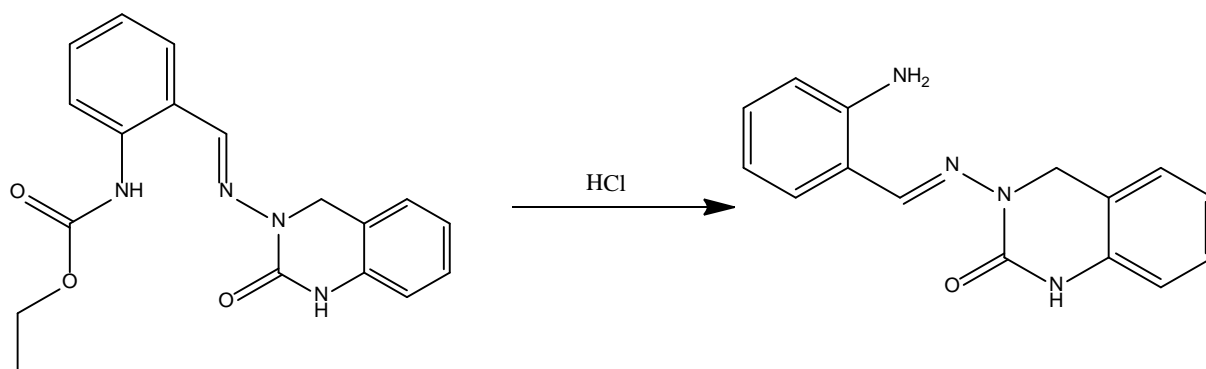


Figura 28. Desprotección del ciclo hidroquinazolónico a través del grupo carbamato para su funcionalización.

Por último, el ciclo hidroquinazolónico puede funcionalizarse a través de reacciones típicas sobre los anillos bencénicos tales como nitración, alquilación de Friedel y Crafts, sulfonación, halogenación, etc.

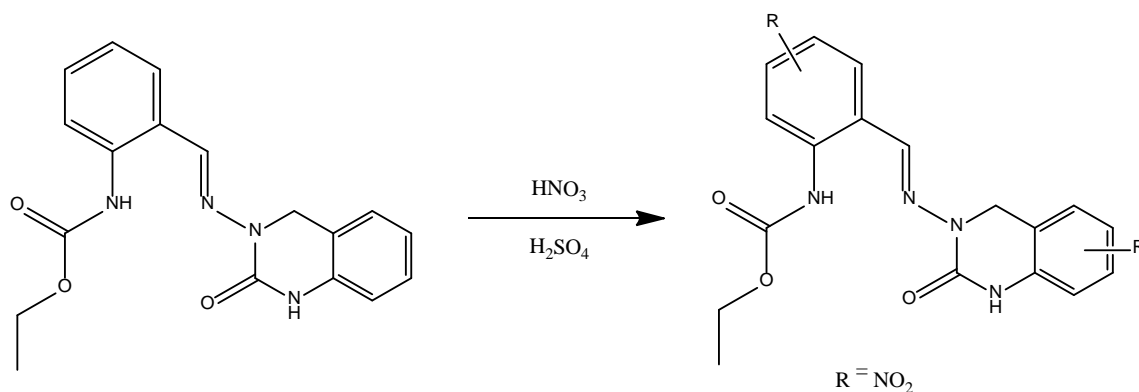


Figura 29. Funcionalización del ciclo hidroquinazolónico por nitración.

9. REFERENCIAS

1. Hopla C.R et. al. Ectoparasites and classification, Rev. Sci. tech. 1994 (4), pp 985-1017
2. Romero Cabello Raúl. Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, Editorial medica panamericana, 2007, pp 1469-1480
3. Martínez Romero Esperanza, Martínez Romero Julio César, Microbios, 2004.
4. Bern C. et. al. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas en los Estados Unidos, Clin Microbiol Rev, 2011 (4), 655-681
5. Hotez Peter J, et. al. An Unfolding tragedy of Chagas Disease in North America, Plos Negl Trop Dis, 2013, 514-518
6. WHO, La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), Nota informativa, Marzo 2014
7. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Tropica, 2010 (1),14-21
8. Salazar Schettino Paz M. et. al. Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *trypanosoma cruzi* en México, Medicina (Buenos Aires), 2005; 65, pp 63-69.
9. Storino R, Milei J. Introducción. Enfermedad de Chagas, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma Argentina, Buenos Aires, 1994; Cap. 1:1-7
10. Toso M. Alberto et. al. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral, Rev Med Chile, 2011, 258-266
11. Sandoval Ruiz César A. et. al. Household risk factors associated to infestation of *Triatoma dimidiata*, the Chagas disease vector in Central Region of Veracruz, Mexico. Salud pública Méx, 2014, 213-220
12. Cruz-Reyes Alejandro, Pickering-López José Miguel, Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – A Review, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101 (4), 345-354
13. Apt B. Werner, Zaluntay A. Inés. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, Rev Med Chile, 2011, 247-257
14. Prata A. Abordagem general do paciente chagásico, Clínica e terapéutica do doença de Chagas, Um manual para o clínico general. Rio de Janeiro, Fio Cruz, 1997, pp 115-126
15. Rivera Gildardo, Bocanegra-García Virgilio et. al. New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi* advances and perspectives, Current medicinal chemistry, 2009, 16, 3286-3293
16. Patterson Stephen, et. al. Dihydroquinazolines as a Novel Class of Trypanosoma Brucei Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography, Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 6514-6530
17. Raymond J. Abraham, et. al. ^1H chemical shifts in NMR: Part 19. Carbonyl anisotropies and steric effect in aromatic aldehydes and ketones, Magnetic Resonance in Chemistry, 2003, 26-36
18. Raymond J. Abraham et. Al. ^1H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on ^1H chemical shifts, Mag Res Che, 2006, 491-509
19. Cremer D. Pople JA, 1975, J Am Chem Soc 97:1354-1358
20. Ying Duan, et. al. Palladium-catalyzed asymmetric hydrogenation of fluorinated quinazolinones, Tetrahedron Letters, 2013, 6161-6163
21. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, Journal of Computational Chemistry, 2010, 455-461

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1

Tabla 1. Datos del cristal y del refinamiento para el intermediario 5

Intermediario 5	Parámetro
Formula empírica	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃
Peso formula	338.4
Temperatura	273(2) K
Longitud de onda	0.71073Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /c
Dimensiones de la celda unitaria	a = 7.5046 (3) Å
	b = 20.7529 (11) Å
	c = 11.1743 (4) Å
	α = 90.000 (0)°
	β = 97.890 (0)°
	γ = 90.000 (0)°
Volumen	1723.82 (7) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.30 g/cm ³
Coeficiente de absorción	0.091 mm ⁻¹
F(000)	712.0
Rango de theta para la colección de datos	4-26.7°
Rango de índices	-9 ≤ h ≤ 9, -26 ≤ k ≤ 25, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexiones colectadas	3581
Reflexiones independientes	2088
Cumplimiento de theta (26.7°)	100%
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos/restricciones/parámetros	2088/0/226
Calidad de ajuste en F ²	1.067
Índice final de R [1>2sigma(1)]	R1 = 0.063, wR2 = 0.138
Índice R (todos los datos)	R1 = 0.126, wR2 = 0.166
Densidad electrónica residual	0.166 y -0.153 e Å ⁻³

Tabla 2. Longitudes de enlace para el intermediario 5 (Å)

Enlace	Distancia	Enlace	Distancia	Enlace	Distancia	Enlace	Distancia
O(2) - C(2)	1.2298(1)	O(20) - C(20)	1.2020(1)	O(21) - C(20)	1.3334(1)	O(21) - C(22)	1.4482(1)
N(1) - C(2)	1.3456(1)	N(1) - C(9)	1.3943(1)	N(3) - N(11)	1.3690(1)	N(3) - C(2)	1.3729(1)
N(3) - C(4)	1.4530(1)	N(11) - C(12)	1.2760(1)	N(19) - C(14)	1.3924(1)	N(19) - C(20)	1.3603(1)
C(4) - C(10)	1.4913(1)	C(5) - C(6)	1.3793(1)	C(5) - C(10)	1.3814(1)	C(6) - C(7)	1.3708(1)
C(7) - C(8)	1.3791(1)	C(8) - C(9)	1.3859(1)	C(9) - C(10)	1.3853(1)	C(12) > C(13)	1.4584(1)
C(13) - C(14)	1.4121(1)	C(13) - C(18)	1.3918(1)	C(14) - C(15)	1.3929(1)	C(15) - C(16)	1.3691(1)
C(16) - C(17)	1.3629(1)	C(17) - C(18)	1.3812(1)	C(22) > C(23)	1.4107(1)		

Tabla 3. Ángulos de enlace seleccionados para el intermediario 5 (°)

Enlace	Ángulo	Enlace	Ángulo
C(20) - O(21) - C(22)	117.61(1)	C(4) - C(10) - C(9)	120.03(1)
N(11) - N(3) - C(4)	120.58(1)	C(12) - C(13) - C(14)	124.62(1)
C(14) - N(19) - C(20)	126.01(1)	N(19) - C(14) - C(13)	119.21(1)
N(1) - C(2) - N(3)	116.47(1)	C(14) - C(15) - C(16)	120.93(1)
C(5) - C(6) - C(7)	119.50(1)	C(13) - C(18) - C(17)	121.73(1)
N(1) - C(9) - C(8)	120.76(1)	O(21) - C(20) - N(19)	108.81(1)
C(4) - C(10) - C(5)	120.79(1)	N(11) - N(3) - C(2)	114.00(1)
N(11) - C(12) - C(13)	121.72(1)	N(3) - N(11) - C(12)	120.17(1)
C(14) - C(13) - C(18)	118.29(1)	O(2) - C(2) - N(3)	121.49(1)
C(13) - C(14) - C(15)	118.76(1)	C(6) - C(5) - C(10)	120.80(1)
C(16) - C(17) - C(18)	119.16(1)	C(7) - C(8) - C(9)	119.42(1)
O(20) - C(20) - N(19)	126.60(1)	C(8) - C(9) - C(10)	120.27(1)
C(2) - N(1) - C(9)	125.18(1)	C(5) - C(10) - C(9)	119.12(1)
C(2) - N(3) - C(4)	125.05(1)	C(12) - C(13) - C(18)	117.09(1)
O(2) - C(2) - N(1)	122.04(1)	N(19) - C(14) - C(15)	122.03(1)
N(3) - C(4) - C(10)	112.60(1)	C(15) - C(16) - C(17)	121.06(1)
C(6) - C(7) - C(8)	120.81(1)	O(20) - C(20) - O(21)	124.58(1)
N(1) - C(9) - C(10)	118.97(1)	O(21) - C(22) - C(23)	111.11(1)